T2R2 東京工業大学リサーチリポジトリ
Tokyo Tech Research Repository

論文 / 著書情報
Article / Book Information

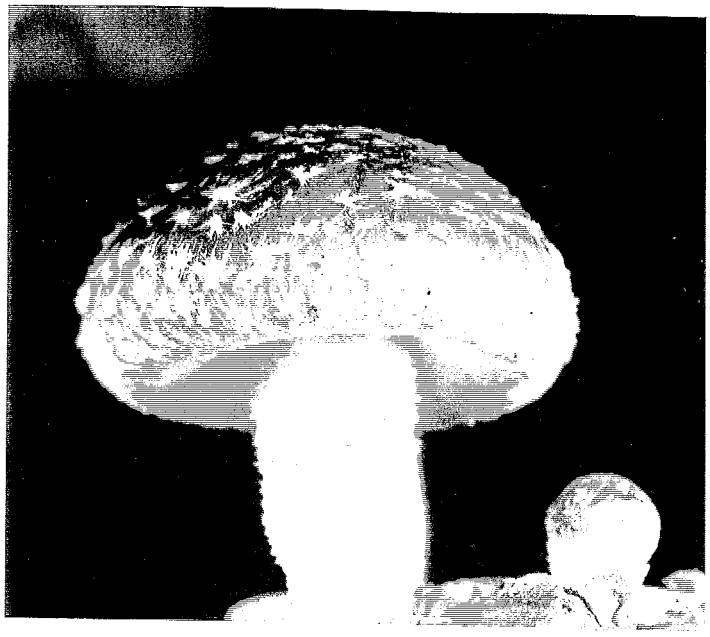
題目(和文)	担子菌ras相同遺伝子及び形態分化関連遺伝子の分子遺伝学的研究
Title(English)	
著者(和文)	梶原将
Author(English)	SUSUMU KAJIWARA
出典(和文)	学位:理学博士, 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第2660号, 授与年月日:1993年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:
Citation(English)	Degree:Doctor of Science, Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第2660号, Conferred date:1993/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

Powered by T2R2 (Tokyo Institute Research Repository)

担子菌*ras*相同遺伝子及び形態分化関連遺伝子の分子遺伝学的研究

東京工業大学大学院　総合理工学研究科
生命化学専攻　博士課程

梶原　将



Lentinus edodes

Pleurotus ostreatus

Coprinus cinereus

目次

第１章　緒論　1

第２章　シイタケの*ras*相同遺伝子*Le.ras*の単離と遺伝子解析　7

第1節　序論　7

第2節　材料と方法　9

2-2-1　菌株　9
2-2-2　プラスミド及びファージDNA　10
2-2-3　培地　11
2-2-4　酵素と反応　13
2-2-5　DNAの調製　13
2-2-6　担子菌の全RNAの調製　15
2-2-7　DNA,RNAの定量法　16
2-2-8　生育の測定　16
2-2-9　担子菌シイタケの子実体形成方法　16
2-2-10　アガロースゲル電気泳動　16
2-2-11　アガロースゲルからのDNAの回収　16
2-2-12　大腸菌の形質転換法　17
2-2-13　Poly(A)$^+$RNAの精製　17
2-2-14　cDNAライブラリーの作製　18
2-2-15　DNAの標識　19
2-2-16　ハイブリダイゼーション　19
2-2-17　塩基配列決定法　20
2-2-18　その他　21

第3節　v-Ha-*ras*とハイブリダイズする染色体DNA断片の分離　22

第4節　*Le.ras*の塩基配列及び推定アミノ酸配列の決定　23

2-4-1　1.2kb*Hin*dIII-*Xba*I断片の塩基配列の解析　23
2-4-2　*Le.ras* 遺伝子の一次構造解析　23
2-4-3　*Le.*Rasタンパク質と他のRas/RASタンパク質とのアミノ酸配列における比較　24

第5節　*ras*相同遺伝子の子実体形成過程における転写発現パターン　25

第6節　考察　26

第３章　形態分化関連遺伝子*priA*及び*priB*の単離と遺伝子解析　28

第1節　序論　28

第2節　材料と方法　29

3-2-1　菌株　29
3-2-2　プラスミド及びファージDNA　30
3-2-3　ハイブリダイゼーションのプローブ除去　30
3-2-4　塩基配列決定法　31
3-2-5　データベースを利用しての塩基配列及びアミノ酸配列の検索　31
3-2-6　その他　31

第3節　priAの単離と塩基配列の決定　32

第4節　*priA*の子実体形成過程における転写発現パターン　33

第5節　*priB*cDNAの塩基配列の確定と*priB*の子実体形成過程における転写発現パターン　33

第6節　*priA*及び*priB*の推定遺伝子産物の構造特性　34

第7節　考察　36

第４章　*Le. ras*、*priA*及び*priB*遺伝子の制御領域の解析と担子菌の遺伝子発現ベクターへの活用　38

第1節　序論　38

第2節　材料と方法　40

4-2-1　菌株　40
4-2-2　プラスミド及びファージDNA　41
4-2-3　プライマー　42
4-2-4　培地　42
4-2-5　酵素と反応　44
4-2-6　Poly(A)$^+$RNAの精製　44
4-2-7　プライマー伸長法[109)]　44
4-2-8　PCR(Polymerase Chain Reaction)　45
4-2-9　出芽酵母の形質転換法　45
4-2-10　シイタケのプロトプラスト調製法　45
4-2-11　ヒラタケの形質転換法　46
4-2-12　ヒトヨタケの形質転換法　47
4-2-13　その他　47

第3節　*Le. ras*、*priA*及び*priB*遺伝子の制御領域の分離　48

第4節　*Le. ras*、*priA*及び*priB*遺伝子の制御領域の構造特性　48

4-4-1　*Le. ras*遺伝子のプロモーターとターミネーター領域の塩基配列の決定　48
4-4-2　*priA*遺伝子のプロモーターとターミネーター領域の塩基配列の決定　49

4-4-3　*priB*遺伝子のプロモーターの塩基配列の決定　50
4-4-4　CT-rich sequenceの高次構造の解析　50

第5節　*Le.ras*、*priA*及び*priB*遺伝子の制御領域の転写開始点の分析　51

第6節　担子菌の遺伝子発現ベクター
の構築及び担子菌への導入の試み　52

4-6-1　担子菌の遺伝子発現ベクターの構築　52
4-6-2　担子菌用遺伝子発現ベクターを用いての
担子菌への形質転換の試み　53
4-6-3　*priB*cDNA中の構造遺伝子下流で見つかった
プロモーター様モジュールのプロモーター活性の解析　54
4-6-4　シイタケMS-LE1610株の直鎖状DNAプラスミドpLLE1及び
ヒラタケMS-PO23株の直鎖状DNAプラスミドpLPO3由来の
出芽酵母内でARS能を持つ断片の担子菌内での性質　55

第7節　考察　56

第５章　結論　60

参考文献　63

報告論文　71

謝辞　72

第１章　緒論

E.P.Odumは、1953年の著書「生態学の基礎（Fundamentals of Ecology)」の中で、生態系は 4つの基本単位から構成されることを示した。すなわち、基礎的無機物及び有機化合物を指す無生物的物質、無機物質等から食物を作ることができる緑色植物（生産者）、緑色植物を食べる動物や非緑色植物及びその動物を食べる肉食動物（消費者）、原形質などの有機化合物の無機物化を行う細菌や菌類（還元者）の4つである。担子菌類はこの中で菌類（還元者）の多数を占める真菌類に属しており、その数1,100属16,000種（G.C.Ainsorth and G.R.Bisby(1971))にもおよぶ多種多彩な生物である。また地表、特に森林では、木材や落葉を分解して有機物を無機物に交換するいわゆる物質循環を担う主役ともいうべき存在であり、その一方で、植物と共生してその生育を助ける役割も果たしていて、古来から地球上の生態系の中で無くてはならないものであった。

さて、一様に担子菌と言っても各々が個性を持っており、生態学的には上述した 2つの働き（還元性及び共生性）を基に分類されている。他の生物の遺体を利用する腐生性をもつ菌は、栄養を摂取するものによって木材腐朽菌、落葉分解菌及び糞生菌に分けられる。これら腐生菌は、それぞれ木材、木材以外の落ち葉や枯れ草、動物の糞尿や遺体の中に存在する他の微生物ではあまり分解できないセルロースやリグニン等を主に分解している[1)]。木材腐朽菌の中にはシイタケ(*Lentinus edodes*)、ヒラタケ(*Pleurotus ostreatus*)、ナメコ(*Pholiota nameko*)等の身近な担子菌（キノコ）が含まれている。共生性をもつ菌は、樹木の根と共生して菌根(Mycorrhiza)をつくる一群で菌根菌と呼ばれている。菌根は共生菌(Symbiont)の菌糸が植物細胞の中へ侵入するか否かで、内生菌根と外生菌根、両方の特徴を持つ内外生菌根に分けられている。有名なマツタケ(*Tricholoma matsutake*)は、外生菌根を形成する菌の仲間である。菌根菌は樹木から糖類などの栄養をもらい、反対に菌は樹木の無機栄養素の摂取を増加させたり、抗生物質などを出して周りの微生物を追い出す役目を行って、樹木の

成長を促進させている[2)]。

さらに、視点を変えて細胞学的側面から担子菌の生活環を捉えると興味深い現象が幾つも見つかる。 図1-1に担子菌の生活環を示した。担子菌は一般に四極性交配型（2種類(AとB)の不和合性因子によって支配された交配型）であり、不和合性因子の異なる一次菌糸(n)同士が菌糸成長後、接触によって接合する。この際酵母などの様に直ちに核融合し複相核(2n)になるのではなく、 2つの核が同調的に核分裂し二次菌糸(重相核,n+n)として成長する。二次菌糸の成長が進んだ後、適切な外部環境条件下になると二次菌糸が凝集して菌叢（菌糸塊）を形成し、そこから子実体原基を経て生殖器官である大型の子実体（キノコ）を形成する。子実体形成後、菌傘の下部（子実下層）にある先端細胞に母細胞である担子器が形成され、そこで初めて核融合し複相核(2n)となり、直ちに減数分裂して担子胞子を形成する。この担子胞子が担子器から離れ発芽することによって新たに一次菌糸の成長過程に進んでいく。この様に真菌類における代表的な形態分化、子実体形成や多くの生物とは異なり複相核(2n)の時期が極めて短いなど担子菌には特有の現象が多々見られる。

以上述べたように、担子菌には独特の代謝系を持つものや植物との共生という珍しい栄養摂取方法を持つものが存在し、更にその生活環の中に担子菌独特の現象を有するという魅力ある研究対象である。これらの担子菌特有の現象を分子レベルで理解するためには、一つには分子遺伝学的、遺伝子工学的技法の確立が重要であるが、担子菌は他の微生物に比べ取り扱いの難しさやその生活環の複雑さなどから、最近までその開発に関わる研究は遅れていた。しかしながら、ようやく5～6年前から、我々のものも含めそれを志向した基礎的、基盤的研究が開始された。

遺伝子操作系を確立するためには、次の事項を解決しなければならない。

1)担子菌遺伝子の単離

2)遺伝子導入ベクターの構築

3)担子菌の形質転換法の開発

はじめに、 本研究を行う以前のこれら3つの事項に関する研究状況、背景を以下に述べる。

1)の担子菌遺伝子については、ヒトヨタケ(*Coprinus cinereus*) からトリプ

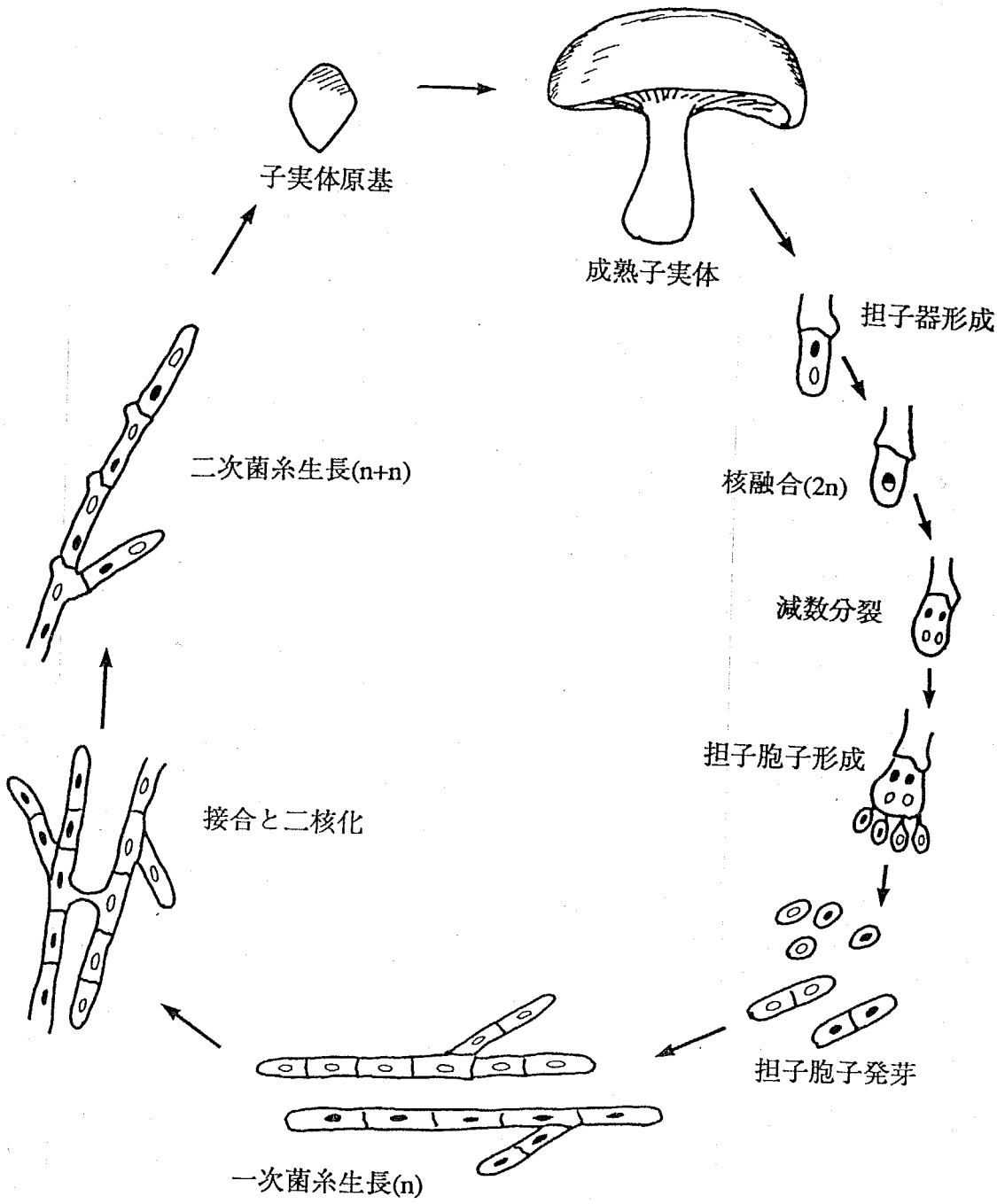

子実体原基
成熟子実体
担子器形成
核融合(2n)
減数分裂
担子胞子形成
担子胞子発芽
一次菌糸生長(n)
接合と二核化
二次菌糸生長(n+n)

図1-1　担子菌の生活環

トファン合成酵素の遺伝子*TRP1*[3]が、スエヒロタケ(*Schizophyllum commune*)から二次菌糸のみで発現する遺伝子*Sc1*[4],*Sc3*,*Sc4*[5]が、*Phanerochaete chrysosporium*(和名ナシ)からリグニン分解酵素群の11の遺伝子[6]がそれぞれ単離、同定されている。

2)の遺伝子導入ベクターを構築する為には、次の3つの要素が必要となる。

A)遺伝子発現制御に関わるDNA配列

B)自律複製または染色体挿入に関わるDNA配列

C)遺伝子導入株を選択するためのマーカー遺伝子

遺伝子発現制御に関わるDNA配列としては、プロモーター及びターミネーターが考えられる。担子菌由来のものが最適あるが、最近まで真正担子菌遺伝子の制御領域については、Skrzyniaらがヒトヨタケのトリプトファン合成酵素(*TRP1*)遺伝子上流域が*TRP1*遺伝子の発現に関わっていることを報告しているだけである[3]。Wangらがキノコを形成しない原生担子菌クロボキン(*Ustilago maydis*)の熱ショックタンパク質(*hsp70*-like)遺伝子のプロモーターに、放線菌(*Streptomyces hygroscopicus*)由来のハイグロマイシンBリン酸転移酵素(*hph*)遺伝子を連結したプラスミドを構築して、クロボキン(*U. maydis*)の形質転換を行った。その結果ハイグロマイシンB耐性の形質転換株が得られ、*hsp70*-likeのプロモーターが機能することが確認されている[7]。BejとPerlinは、子嚢菌の一種である*Cochliobolus heterostrophus*(和名不明)のプロモーターにhph遺伝子を連結したプラスミドを構築して、同属のクロボキン(*U. violacea*)の形質転換を成功させ、子嚢菌のプロモーターがクロボキンでも有効であることを示した[8]。

複製に関わるDNA配列としては、担子菌で機能する複製開始点(ori: origin of replication)または自律複製配列(ARS:Autonomously Replication Sequence)が必要である。ARSは、真菌類で最初に形質転換系が確立された出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)でこれまでに詳細な研究が行われていて、ARS機能の発現に必須な共通配列5'-($^{A}/_{T}$)TTTAT($^{A}/_{G}$)TTT($^{A}/_{T}$)-3'が Williamsonらによって提唱されている[9]。さらに、出芽酵母内でARS能をもつ他の子嚢菌の染色体DNA断片が、元の菌内でもARSとして機能することが報告されている[10]。しかし、一部の菌を除いては、出芽酵母で機能するARS断片が元の菌でARS能を

持つとは限らないようである[11]。これまでの担子菌類におけるARS等の研究としては、Tsukudaらがクロボキン(*U. maydis*)染色体DNA断片からクロボキン内で自律複製し、形質転換効率を数千倍上昇させるARS(UARS1)を単離した[12]。Randallらは、*P. chrysosporium*内に存在するプラスミドpMEからDNAから*P. chrysosporium*中で自律複製するDNA断片を分離した[13),14)]。また、片寄と著者らがシイタケからミトコンドリア内在性直鎖状プラスミドpLLE1を発見し、このpLLE1から出芽酵母でARS能を持つ1.4kbDNA断片を単離して、解析を行っている[15]。しかし、この断片が担子菌内でARSとして働くか否かは解っていない。

染色体挿入に関わるDNA配列としては、rDNAや染色体に多コピー存在するDNAが有力な候補である。これに関連して、著者らがシイタケのミトコンドリアDNAから出芽酵母内で染色体挿入を惹起するDNA断片を単離して、その挿入部位の解析を行った[16]。この断片についても、まだ担子菌内での効果は検討していない。

遺伝子導入株を選択するためのマーカー遺伝子としては、劣性突然変異株を相補する遺伝子であるアミノ酸生合成遺伝子等が多数報告されているが[17]、これら遺伝子は変異回復を行える劣性突然変異株のみに有効で、多種多様な菌株で利用できるわけではない。一方で、上記した*hph*遺伝子[18]や大腸菌のTn903及びTn5由来のアミノグリコシドリン酸転移酵素（各々*APHI*[19] *APHII*[20]）遺伝子は、各々抗生物質ハイグロマイシンBや G418を不活性化し、生物に耐性を与える遺伝子であり、大体の真核生物はハイグロマイシンBや G418に感受性であるので、最近*hph*遺伝子や*APHI*(*APHII*)遺伝子が多用されてきている。

最後に3)の担子菌の形質転換法の開発については、1983年にクロボキン[21]、1985年に*Rhodosporidium toruloides*[22]、の2種類の原生担子菌での形質転換法が報告され、1986年に真正担子菌で初めてスエヒロタケ[23]による形質転換法が開発されて以来、1987年にヒトヨタケ(*C. cinereus*)[24]、1989年に*P. chrysosporum*[25]、1990年にヒトヨタケの別種(*C. bilanatus*)[26]の形質転換法が次々と開発された。さらに、1990年に菌根菌で初めてキツネタケ(*Laccaria laccata*)[27]での形質転換法が開発された。1992年になってヒラタケ[28]及びワカフサタケ(*Hebeloma cylindrosporum*)[29]の形質転換法が開発された。クロボキンとヒトヨタケ(C.cinereus)を除いては、すべてプロトプラストーPEG 法であり、そ

の詳細は菌種によってさまざまであった[30]。

以上、それまでの研究状況や背景を考慮し、本研究では、まず担子菌の遺伝子を単離することを考えた。当初から、上述した担子菌の生活環の中で特に子実体形成という形態分化に大変興味を持っており、これに関連する或いはすると予想される遺伝子を対象にした。

これまでの子実体形成に関する研究としては、以下の研究が報告されている。宇野らはヒトヨタケの一次菌糸FIS$^+$株にヒトヨタケ及びシイタケの子実体抽出液を加えることによって、子実体形成が誘導でき、その誘導物質がアデノシン-3'5'-環状一リン酸(cAMP)であることを突きとめた[31]。 さらに、ヒトヨタケの子実体形成過程において、cAMPを合成するアデニレートシクラーゼ活性及びcAMPを分解するホスホジエステラーゼ活性を各々測定し、子実体原基形成に先立ってアデニレートシクラーゼ活性が上昇することを示した[32]。 同様に、当研究室の高木らはシイタケの子実体原基形成時に細胞内cAMP含量が増大し、アデニレートシクラーゼ活性が上昇することを示した[33]。 また川合らは、スエヒロタケの培養中にアオカビ(*Penicillium funiculosum*) が混入したところ、両菌株の接触部にスエヒロタケの子実体が多数形成されることを観察した[34]。そして、アオカビやスエヒロタケそのものからスヒィンゴ脂質であるセレブロシドを同定し、セレブロシドがスエヒロタケの子実体形成を誘導することを示した[35]。村尾らは、アミスギタケ(*Favolus arcularius*) の子実体形成誘導活性を示す物質、アントラニル酸を同定した[36]。

cAMPに関しては、酵母から哺乳類まで様々な生物でセカンドメッセンジャーとして同定され、それを合成するアデニレートシクラーゼと共に細胞内シグナル伝達系の一つとして、精力的に研究されている。中でも出芽酵母(*S.cerevisiae*)においては、シグナル伝達のカスケードが大体解明されていて、図1-2に示した様に*ras*遺伝子産物がアデニレートシクラーゼ(*CYR1*) の調節サブユニットとして機能していることが解っている[37]。また細胞性粘菌(*Dictyostelium discoideum*)では、2種類のアデニレートシクラーゼ遺伝子(*ACA*と*ACG*)が単離されていて[38]、その調節には2種類の*ras*相同遺伝子(*Ddras*[39]と*DdrasG*[40])は直接関わっていないが、細胞内cAMP量の一時的な上昇が、栄養増殖時と分化初期に最大限転写される*DdrasG*の転写を抑え、同時に分化過程での偽変形体段階で

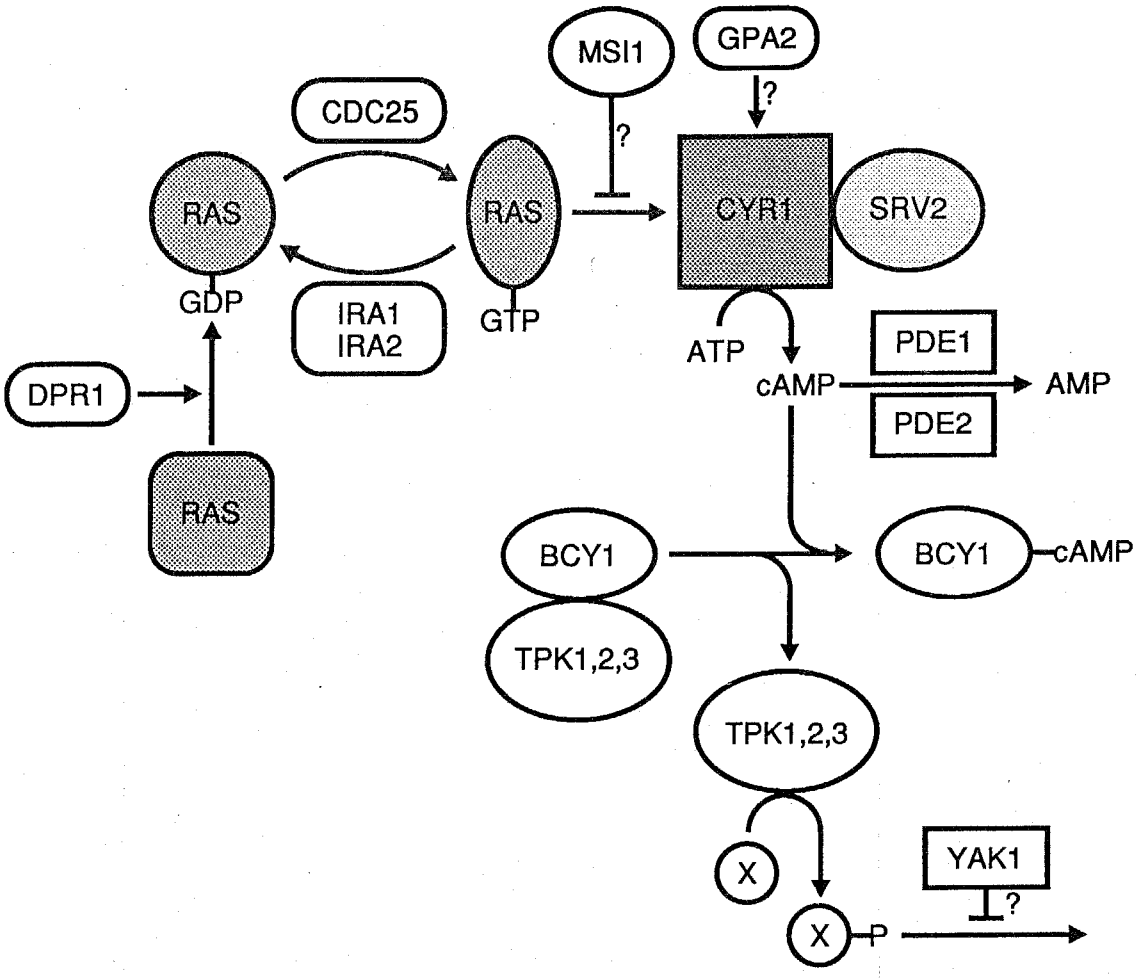


図1-2　出芽酵母（*S. cerevisiae*）のRAS-cAMPによるシグナル伝達系

中福雅人、田中一馬：実験医学,8,1308-1317(1990)より転載

最大限転写される*Ddras*の転写を促進することが報告されている[41]。

そこで、子実体形成諸過程がはっきりと区別でき、それらを実験材料として量的に容易に入手できるシイタケを対象に、シイタケ染色体DNAよりcAMPの合成をつかさどるアデニレートシクラーゼ遺伝子と*ras*相同遺伝子の単離を試みた。その結果、アデニレートシクラーゼ遺伝子は残念ながら得られなかったが、*ras*相同遺伝子としては*L.edodes ras*(*Le.ras*)遺伝子が得られ、同時に、*ras*相同遺伝子をクローニングするためのプローブとして使用していたHarveyのラット肉腫ウィルス*ras*(v-Ha-*ras*)の塩基配列に多少の部分的相同性を持つが*ras*とは異なる新規の遺伝子*priA*も得られた。またこの2種類の遺伝子の子実体形成過程における転写発現を解析した。*Le.ras*遺伝子は構成的に、*priA*遺伝子は子実体原基中で多量に発現していた。更に当研究室の遠藤がシイタケの子実体原基中に特に多量に存在するmRNAについて作製したcDNAライブラリーより得た遺伝子*priB*についてその一次構造を確定し、以上 3つの遺伝子産物の構造解析を行った。

次に単離した3つの遺伝子の制御領域（プロモーター及びターミネーター領域）を用い遺伝子導入ベクターを構築することを考えた。

上述した 3つの遺伝子の制御領域と考えられる上流域及び下流域をクローニングして、その構造特性を解析した。また、上流域についてはその遺伝子の転写開始点を分析した。続いて*Le.ras*遺伝子のプロモーター及び*priA*遺伝子のターミネーター領域とG418耐性の*APHI*遺伝子を用いて、遺伝子導入ベクターpLC1-genを構築した。最後に構築したベクターpLC1-genを用い、シイタケ、ヒトヨタケ、ヒラタケでの形質転換を試みた。

また別個の実験であるが、複製に関するDNA配列の検索として、上記したシイタケのプラスミドpLLE1由来のARS断片[15]及びヒラタケMS-PO23株より得られたプラスミドpLPO3由来のARS断片[42]を、ヒトヨタケの*TRP1*遺伝子を含む染色体挿入型ベクターpCc1001に組み込み、ヒトヨタケの*trp1*$^-$株の形質転換を行った。

第２章　シイタケの*ras*相同遺伝子*Le.ras*の単離と遺伝子解析

第1節　序論

*ras*遺伝子はほとんどの真核生物の間で高度に保存されている低分子量GTP結合性タンパク質をコードしている。これらの遺伝子の突然変異体はほ乳類の細胞を癌化することができるもしくは癌を誘導することができる。さらにほ乳類において、Rasタンパク質は血清成長因子とそのレセプターとの結合によって誘導される何らかのシグナルを細胞内において伝達する、いわゆる信号変換因子(signal transducer) として機能すると提案されているが、そのシグナル伝達系の実体はまだ明らかになっていない[37]。

出芽酵母には2種類の*ras*遺伝子(*RAS1, RAS2*)があり、これらの*ras*遺伝子産物はcAMPを介するシグナル伝達系の中で、cAMPを合成するアデニレートシクラーゼを調節することによって、細胞周期の制御の一因子として働いていることが明らかになっている[43]。一方、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)は、1種類の*ras*遺伝子(*ras1*)しかなく、その*ras*遺伝子産物は、直接アデニレートシクラーゼの調節には関わっておらず[44]、むしろ接合フェロモンのシグナル伝達系に関与していると示唆されている[45]。また、細胞性粘菌においても出芽酵母と同様に2種類の*ras*遺伝子(*Ddras, DdrasG*)があり[39),40)]、*DdrasG*は栄養増殖時と分化初期に最大限に転写発現され、*Ddras*は分化過程での偽変形体段階において最大限に転写発現されることが報告されている[41]。これらの*ras*遺伝子産物は細胞性粘菌に存在する2つのアデニレートシクラーゼ(*ACA, ACG*)の調節には関与していないが[38]、細胞内cAMP量の一次的な上昇が、*DdrasG*の転写を抑え、同時に*Ddras*の転写を促進することから、出芽酵母とは異なる意味でcAMPと相関性があると考えられている。

以前に当研究室の高木らが、担子菌シイタケの子実体形成に伴う菌体内cAMP量及びアデニレートシクラーゼ活性の変動を追跡した[33]。それによると、cAMP量は子実体原基形成直前の菌叢（菌糸塊）時期に急激に増大し最大となり、アデニレートシクラーゼ活性もこの時期に増大し、子実体原基形成時に最大活

性を示している。またこれ以前にも、宇野らがヒトヨタケでほぼ同様な結果を得ている[32]。

そこでこの章では、シイタケからアデニレートシクラーゼ遺伝子或は *ras*相同遺伝子を単離することを考え、出芽酵母のアデニレートシクラーゼ(*CYR1*)遺伝子[46]と Harveryのラット肉腫ウィルスから得られた癌遺伝子v-Ha-*ras*[47]をプローブにして、シイタケFMC2株の染色体DNAに対し異種サザンブロット解析を行った。その結果、*CYR1*をプローブにした場合にはクローニングの可能性を示唆するほどの明確なハイブリダイゼーションシグナルは得られなかったが、v-Ha-*ras*をプローブとしたサザンブロットでは二種類のハイブリダイゼーションバンドが得られたので、その内のひとつ(*Le.ras*)をクローニングし、遺伝子解析を行った。

第2節　材料と方法

2-2-1　菌株

この章での実験に使用したシイタケ(*L.edodes*)と大腸菌(*Escherichia.coli*)の菌株、遺伝子型は表2-1に示した。

表2-1　使用菌株

Strains	Genotype	Reference
L.edodes		
FMC2	Wild Type	48)
E.coli		
JM109	F' *traD36 proA*$^{+}$ *proB*$^{+}$ *lacI*^{q} *lacZ*Δ *M15/recA1 endA1 gyrA96* (Nal^{r}) *thi hsdR17 supE44 relA1* Δ *(lac-proAB) mcrA*	49)
C600	*thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21 supE44 mcrA*	50)
C600Hfl	*thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21 supE44 mcrA hflA150 chr*::Tn*10(tet*^{r}*)*	51)

2-2-2　プラスミド及びファージDNA

この章での実験に使用した大腸菌プラスミド及びファージDNAは表2-2に示した。

表2-2　プラスミド及びファージDNA

Vector	Size(kb)	Genetic Marker	Source or Reference
Plasmid			
pBS-9	4.8	Amp^r	J.C.R.B.*
(pBR322-v-Ha-*ras*)			
YEp13-*CYR1*-11	15.9	*LEU2* Amp^r Tet^r	46)
pUC18	2.7	Amp^r lacZ	49)
pUC19	2.7	Amp^r lacZ	49)
Bacteriophage			
λgt10	43.3	cI	52)
M13mp18	7.3	lacZ	49)
M13mp19	7.3	lacZ	49)

*:Japanese Cancer Research Resource Bank

2-2-3 培地

この章での実験に使用した培地の組成及びその作製方法を以下に示した。

1)Luria-Bertani(LB)培地

1% Bacto-tryptone(DIFCO)
0.5% Bacto-yeast extract(DIFCO)
0.5% NaCl , pH 7.0

寒天培地には、1.5%(w/v)の寒天（和光純薬）を加えた。
軟寒天培地(top agar)には、0.7%(w/v)の寒天を加えた。
抗生物質アンピシリンによる選択を行う場合は、最終濃度が50μg/mlになるように添加した。
ファージの調製用には、$MgSO_4$及びMaltoseを最終濃度が各々10mM,2%になるように添加した。

2)SOB培地

2% Bacto-tryptone(DIFCO)
0.5% Bacto-yeast extract(DIFCO)
0.05% NaCl
2.5mM KCl
10mM $MgCl_2$, pH 7.0

MgCl2はオートクレーブ滅菌後、2M $MgCl_2$を1/200量加えることで調製した。
寒天培地には、1.5%(w/v)の寒天を加えた。
抗生物質アンピシリンによる選択を行う場合は、最終濃度が50μg/mlになるように添加した。

3)SOC培地

SOB培地にオートクレーブ滅菌した1M glucoseを1/50量加えることで調製した。

4)M9最少培地

M9 salts

0.6% $NaHPO_4$

0.3% KH_2PO_4

0.05% NaCl

0.3% NH_4Cl

0.2% glucose

0.1mM $CaCl_2$

2mM $MgSO_4$

M9 salts, glucose, $CaCl_2$, $MgSO_4$を別々にオートクレーブ滅菌後、混合した。

寒天培地には、1.5%(w/v)の寒天を加えた。

抗生物質アンピシリンによる選択を行う場合は、最終濃度が50μg/mlになるように添加した。

CASAMINO ACID(DIFCO)を加える際は、最終濃度が0.5%になるようにした。

5)SMY培地

1% saccharose

1% 麦芽エキス（極東）

0.4% 酵母エキス（極東） , pH 5.6

寒天培地には、1.6%(w/v)の寒天を加えた。

6)PSA(PDA)培地

皮をむき芽を取ったジャガイモを約1cm角に切り、このジャガイモ200～300gを1000ml弱の脱イオン水で1時間煮込む。2～3枚重ねのガーゼで濾過し、20gのsaccharose（PDAの場合はglucose）を加え、脱イオン水で1000mlにする。これに寒天を16g加え、オートクレーブ滅菌後固化させた。

7)鋸屑・米糠培地

鋸屑をメッシュふるいでふるい分けをして、粒の大きさを揃える。この鋸屑と米糠を容積比7:1の割合で混合し、含水率が60%になるように脱イオン水を加え、ビーカーに詰めてオートクレーブ滅菌した。

2-2-4　酵素と反応

制限酵素は宝酒造、東洋紡、ニッポンジーンより購入した。Bacterial alkaline phosphatase, T4 polynucleotide kinase, T4 DNA ligase, Klenow enzyme, *Eco*RI methylaseは宝酒造及びニッポンジーンより購入し、これらの酵素を使用する際には使用説明書に従った。DNaseIとRNaseAは、Sigmaより購入し、RNaseAは10mM Tris-HCl(pH 7.5)に10mg/mlになるように溶解し、20分間煮沸してDNaseを失活させた後使用した。Proteinase Kは和光純薬より購入した。塩基配列を決定するためのデレーションプラスミド作製用には、Kilo-Sequence用Deletion Kit（宝酒造）を用いた。

2-2-5　DNAの調製

1)大腸菌からのプラスミドDNAの調製

大腸菌からのプラスミドDNAの調製は、まずClewllとHellinskiの方法[53]を用い、プラスミド保持菌を抗生物質を添加したM9-CASAMINO ACID培地で対数増殖後期まで培養後、100μg/mlの濃度になるように抗生物質クロラムフェニコールを加え、プラスミドの増幅を行った。この菌を集菌し、Sambrookらの成書によるAlkali法を用いてプラスミドDNAを調製した[54]。その後、Radloffらの方法による塩化セシウム(CsCl)－エチジウムブロマイド(EtBr)の密度勾配超遠心法を用いて精製した[55]。少量調製は、Sambrookらの成書のRapid alkali法をもとに行った。

2)大腸菌からのファージDNAの調製

ラムダファージの大量調製は、Yamamotoらの方法により行った[56]。また、ラムダファージからのDNAの抽出は、Sambrookらの成書に従って行った[54]。少量培養は、Yamamotoらの方法を改良して行った。LBプレート上に形成されたプラークをひとつずつパスツールピペットで掻き取り、200μlのSM buffer[0.58 % NaCl,0.2% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,50mM Tris-HCl,0.01% Gelatin;pH 7.5]に懸濁させた。室温にて1時間以上放置後、適量を 100μlの一晩培養した宿主大腸菌に加え37℃で15分間保温し、20mlのLB培地を加え数時間振とう培養した。大腸菌が溶菌し始めたら、クロロホルムを加えてよく懸濁して15,000rpmで5分間遠心した。上清を移しDNaseI,RNaseAを各々1μg/mlとなるように加え、37℃で30分間保温した。この後、Sambrookらの成書にしたがってDNAを抽出し、精製した。

3)M13ファージ一本鎖DNAの調製

2mlのLB培地に、SOB培地で一晩培養した大腸菌JM109の培養液を50μl加え、これにファージプラークを植菌した。37℃で5時間振とう培養した後、培養液1mlを15,000rpmで5分間遠心し上清を回収した。この上清に200μlの20%ポリエチレングリコール(PEG)6000/2.5M NaClを加え、室温15分間放置後15,000rpmで15分間遠心して上清を除き、沈澱を100μlのTE buffer[10mM Tris-HCl,1mM EDTA;pH 7.5]に懸濁した。次に50μgのTE飽和フェノールで1回抽出し、1/10量の3Mの酢酸ナトリウム(pH 5.2)を加えエタノール沈澱を行った。70%エタノールで洗浄後、20μlのTE bufferに溶解してDNA試料とした。

4)担子菌の全DNAの調製

担子菌の全DNAの調製は、Ausubelらの成書より液化窒素を用いた植物の凍結破砕法を一部改良して行った[57]。SMY液体培地で2～4週間振とう培養した担子菌を 4枚重ねのガーゼで集菌し、脱イオン水で洗浄した。次にワーリングブレンダー（佐久間製作所）のカップに液化窒素を入れ、その中に少量ずつ菌体を

入れて凍結させ、ブレンダーを高速で回転させ粉末状になるまで破砕した。この破砕物を、50mlのFalcon2070の半分目ぐらいまで入れ、 20mlの抽出緩衝液[0.1M Tris-HCl,0.1M EDTA,0.25M NaCl,100μg/ml Proteinase K;pH 8.0]を加え迅速に懸濁した。さらに最終濃度が1%になるようにラウリル硫酸ナトリウム(SDS)を加え、55℃で2時間保温し、 続いて2mgのProteinase Kを加えて37℃で一晩保温した後、 10,000rpm,4℃で15分間遠心し、上清に等量のイソプロパノールを加えた。先の閉じたパスツールピペットでDNAを巻き付け、99.5%のエタノールと70%のエタノールで順番に洗浄し10mlのTE bufferに溶かした。TE飽和フェノールで抽出し、さらにTE飽和フェノール:CIAA(ｸﾛﾛﾎﾙﾑ:ｲｿｱﾐﾙｱﾙｺｰﾙ=24:1)[=1:1]での抽出を行って、エタノールで沈澱させた。DNAの沈澱を適量のTE bufferに溶かし、最後に10mg/ml RNaseAを添加し、30分間保温し全DNA試料とした。

2-2-6 担子菌の全RNAの調製

担子菌からの全RNAの調製は、 Chirgwinら[58]とGlisinら[59]の動物細胞からの全RNAの調製法を一部改良して行った。SMY液体培地及び鋸屑・米糠培地で培養した担子菌の菌叢、子実体原基、成熟子実体を脱イオン水で洗浄し、液化窒素の入ったワーリングブレンダーのカップに少しずつ加えた。ワーリングブレンダーで粉末状になるまで破砕し、GTC mixture[4M ﾁｵｼｱﾝ酸ｸﾞｱﾆｼﾞﾝ,25mM ｸｴﾝ酸ﾅﾄﾘｳﾑ,0.1M 2-ﾒﾙｶﾌﾟﾄｴﾀﾉｰﾙ,0.5% N-ﾗｳﾛｲﾙｻﾙｺｼﾝ ﾅﾄﾘｳﾑ,0.1% Antifoam A;pH 7.0]を加え良く混合した。 混合後、ホモジナイザーを用いて高速で5往復ホモジナイズし、その破砕液を9,000rpmで10分間遠心した。上清を4mlのCsCl溶液[5.7M CsCl,0.1M EDTA;pH 7.0]が入った遠心チューブに重層し、32,000rpm,20℃で24時間遠心した。 遠心後、上清を8割程度パスツールピペットで注意深く除きチューブの内壁を2回洗浄し、焼いたカッターナイフでチューブの上8割を切り落とし後、残りの上清を除いた。 続いてチューブに70%のエタノールを加えRNAを析出させ、遠心でエタノールを除いた後、RSB[10mM Tris-HCl,1mM EDTA,0.1% N-ﾗｳﾛｲﾙｻﾙｺｼﾝ ﾅﾄﾘｳﾑ,5% TE飽和ﾌｪﾉｰﾙ;pH 7.5]に溶かした。そしてTE飽和フェノール:CIAA[=1:1]で2回、CIAAで1回抽出を行い、 エタノールで沈澱させた。この沈澱物を10mM Tris-HCl/1mM EDTA/0.1% SDSに溶かし、全RNA試料とした。

2-2-7　DNA,RNAの定量法

260nmの波長の吸光度(A_{260})を測定し、A_{260}=1.0の時のDNA溶液の濃度を50μg/ml、RNA溶液の濃度を40μg/mlとした。

2-2-8　生育の測定

大腸菌の生育の測定は、600nmの波長の濁度(OD_{600})を一定時間毎に測定することにより行った。

2-2-9　担子菌シイタケの子実体形成方法

鋸屑・米糠培地にSMY液体培地で2～4週間培養したシイタケの菌糸を植菌し、25℃,暗黒下で約一ヶ月間培養した。菌糸が培地中に充満したところで17℃,光照明下に移し、さらに約一ヶ月半培養した後、子実体原基及び子実体が得られた。

2-2-10　アガロースゲル電気泳動

Sambrookらの成書により、サブマリン型電気泳動槽を用いて行った[54]。ホルムアルデヒド変性アガロースゲル電気泳動もSambrookらの成書に従って行った。cDNA合成の確認用アルカリアガロースゲル電気泳動は、アルカリアガロースゲルを50mM NaCl/1mM EDTA/1.4% Agaroseの組成で作製し、アルカリ泳動バッファー[30mM NaOH,1mM EDTA]で100Vで2時間泳動した。

2-2-11　アガロースゲルからのDNAの回収

1)低融点アガロース-アガラーゼ法

低融点アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、目的のサイズ付近のDNA断片を切り出した。ゲル断片をエッペンドルフチューブに入れ65℃で約15分間保

温した後、 20μlのゲル当り1unitのアガラーゼ(Sigma) を加えて45℃で3時間以上保温した。 1/25量の5M NaClを加えて、2.5倍量のエタノールでDNAを沈澱させることによりDNAを回収した。

2)DEAEペーパー法

アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、 ゲル上の目的のサイズのDNA断片の上下にカッターナイフで切込みを入れ、 DE81ペーパー(Wattman)を短冊型に切って切込みに挿入し、再度20～30分間泳動した。 DNA断片が全てDE81ペーパーに吸着されたことを確かめ、DE81ペーパーをエッペンドルフチューブに回収した。DE81ペーパーを0.1M NaCl/0.1mM EDTA/10mM Tris-HCl(pH 8.0)で洗浄した後、1M NaClでDNAを溶出させた。最後にエタノール沈澱にてDNAを回収した。

2-2-12 大腸菌の形質転換法

大腸菌の形質転換法は、Inoueらの方法を一部改良して行った[60]。一晩培養した大腸菌0.1mlを10mlのLB培地に植菌し、37℃で振とう培養した。OD_{600}が0.4～0.5に達したところで、氷上で10分間冷却し3,000rpm、4℃で10分間遠心し、沈澱を4mlのT.Buffer[10mM PIPES,15mM CaCl2,250mM KCl,55mM MnCl2;pH 6.7]に懸濁して氷上で10分間冷却した後、 3,000rpm、4℃で10分間遠心した。沈澱を0.8mlのT.Bufferに懸濁し60μlのDMSO(7%)を加えて氷上で10分間冷却した後、この懸濁液をコンピテントセルとした。0.2mlのコンピテントセルとDNA溶液を混合し、氷上で30分間放置した。その後42℃で60秒間保温してから氷上で2～3分間放置し、 0.8mlのSOC培地を加えて37℃で1時間培養した。この培養液を選択用寒天培地に蒔き、37℃で一晩培養した。

2-2-13 Poly(A)$^+$RNAの精製

溶出用緩衝液I[20mM Tris-HCl,0.5M NaCl,1mM EDTA,0.1% SDS;pH 5.6] で平衡化したオリゴ(dT)セルロース1mlをカラムに詰め、滅菌水、 0.1M NaOH/5mM EDTA、滅菌水の順に、それぞれ3mlずつカラムに通した。カラム流出液のpHが8

以下であることを確認してから、5mlの溶出用緩衝液Iでカラムを洗浄した。その間に、3mgの全RNAを滅菌水に溶かし、 65℃で5分間保温した。これに等量の2×溶出用緩衝液Iを加え、室温まで試料を冷やしてから作製したカラム上に注意深く重層した。さらに溶出用緩衝液を加えた後、素通り画分を回収し、再び65℃で5分間保温してから、再度注意深く重層した。 この操作をもう一度繰り返した後、5～10mlの溶出用緩衝液Iで洗浄し、続いて1mlの溶出用緩衝液II[20 mM Tris-HCl,0.1M NaCl,1mM EDTA,0.1% SDS;pH 5.6]を4回通し、各々別々に回収した。 これらの溶出液の吸光度(A_{260})を測定し、4回目の溶出液の吸光度が低い値であることを確認した後、3mlの10mM Tris-HCl/1mM EDTA/0.05% SDS(pH 7.5)でpoly(A)+RNAを溶出させた。 得られたpoly(A)+RNA画分の吸光度(A_{260})を測定し、収率が5%以下であることを確認した後、 0.3mlの3Mの酢酸ナトリウムを加えてエタノール沈澱を行った。 最後に70%エタノールで洗浄後、沈澱を真空ポンプで乾燥させ、滅菌水に溶かしてポリ(A)+RNA試料とした。

2-2-14 cDNAライブラリーの作製

cDNAの合成はAmershamのキット(cDNA合成システム・プラス)を用いて行った。first strand合成用プライマーにはオリゴ(dT)を使用した。first strandとsecond strandに取り込まれた ^{32}Pのアイソトープ量を液体シンチレーションカウンターで測定することによって、それぞれのstrand合成における反応収率を計算した。また、どのくらいのサイズのcDNAが合成されているか確かめるため、first strand合成後の試料及び second strand合成後の試料のアルカリアガロースゲル電気泳動を行った。方法はキットの説明書によった。つぎに、合成したcDNAの*Eco*RI認識部位を、*Eco*RI Methylaseを用いてメチル化した。これにT4 DNA ligaseを用いて*Eco*RIリンカー（宝酒造）をつなぎ、その後制限酵素EcoRIで消化した。次にセファデックスG50でゲル濾過を行い、*Eco*RIリンカー断片を取り除いた。続いて、*Eco*RIリンカーをつないだcDNAとλgt10ベクターの*Eco*RI消化物を、T4 DNA ligaseを用いて連結した。最後に、連結したDNAをin vitroパッケージングキットGIGA PACK GOLD(STRATAGENE)によりパッケージングし、cDNAライブラリーとした。

2-2-15　DNAの標識

DNAの標識にはランダムプライマーDNAラベリング法を用いた。市販のランダムプライマーDNAラベリングキット（宝酒造）を使い標識化合物[α-^{32}P] dCTP (ICN, Amersham)の取り込みを行った。

2-2-16　ハイブリダイゼーション

1)サザンハイブリダイゼーション

DNAをアガロースゲルで電気泳動した後、アガロースゲルに短波長の紫外線を30秒間照射し、そのゲルをアルカリ変性溶液[0.5M NaOH, 1.5M NaCl]に30分間浸した。次にSouthernの方法[61]により、アルカリトランスファー溶液[0.25M NaOH, 1.5M NaCl]を用いて、ゲル中のDNAをナイロンメンブレンフィルターHybond-N(Amersham)に移した。このフィルターを1～5×Denhardt溶液[1×Denhardt:0.02% BSA(SIGMA), 0.02% Ficoll(SIGMA), 0.02% PVP（東京化成)]、100μg/ml変性ニシン精子DNA(SIGMA)及び50%ホルムアミド含む6×SSC[1×SSC:150mM NaCl, 15mM Trisodium Citrate;pH 7.0]に浸し、42℃で2時間以上保温した(プレハイブリダゼーション)。その後、熱変性した^{32}P-標識DNAプローブ溶液を加え42℃で18時間以上ハイブリダイゼーションした。続いて、Blot wash buffer[12mM Na_2HPO_4, 8mM NaH_2PO_4, 2mM $Na_4P_2O_7$, 0.05% SDS]-2×SSC溶液を用いて、フィルターを数回洗い、風乾後オートラジオグラフィーを行った。なお弱い条件下では、プレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションで使用する溶液中のホルムアミドの濃度を20～30%に代えて行った。

2)ノーザンハイブリダイゼーション

ノーザンハイブリダイゼーションは、Sambrookらの成書をもとに行った[54]。RNAをホルムアルデヒド変性アガロースゲルで電気泳動した後、Southernの方法により20×SSCを用いて、ゲル中のDNAをナイロンメンブレンフィルターHybond-Nに移した。フィルターをろ紙上で風乾させた後、真空オーブンで80℃、76

cmHg、2時間焼付けを行った。 以降は2-16-1のサザンハイブリダイゼーションと同様に行った。

3)プラークハイブリダイゼーション

プラークハイブリダイゼーションは、BentonとDavisの方法[62]に従って行った。λ系ファージを一晩培養した宿主大腸菌と試験管内で接触させ、37℃で15分間保温した後、LBプレート上にまき、37℃で一晩培養してプラークを形成させた。ニトロセルロースメンブレンフィルターを接触させてプラークを移し、1)のアルカリ変性溶液で2分2回、 中和液[0.5M Tris,1.5M NaCl;pH8.0]で2分2回、2×SSCで2分2回の順に処理し、1時間風乾した。 その後、真空オーブンで80℃、76cmHg、2時間焼き付けた。以降は1)のサザンハイブリダイゼーションと同様に行った。

4)コロニーハイブリダイゼーション

2-2-12の大腸菌の形質転換法で形質転換した菌を、ニトロセルロースメンブレンフィルターのせたSOB(50μg/ml ｱﾝﾋﾟｼﾘﾝ)プレートにまき、 37℃で一晩培養する。コロニーが生えたフィルター（マスター）を新しいニトロセルロースメンブレンフィルターに重ねコロニーを移し、そのフィルター（レプリカ）をSOB(50μg/ml ｱﾝﾋﾟｼﾘﾝ)プレートに乗せて、 37℃で一晩培養する。レプリカを10%SDSで3分1回、1)のアルカリ変性液で5分2回、3)の中和液で5分2回、2×SSCで5分2回の順で処理して1時間風乾した。その後、真空オーブンで80℃、76cmHg、2時間焼き付けた。続いて2×SSCに浸し、プレウォシュ溶液[5×SSC,0.5% SDS,1mM EDTA;pH 8.0]中で50℃、30分間洗浄した。 以降は1)のサザンハイブリダイゼーションと同様に行った。

2-2-17 塩基配列決定法

1)塩基配列決定用試料の調製

2-2-5 1)のAlkali法で抽出したプラスミドDNA溶液に3/5容の 20% PEG6000/2.5M NaCl溶液を加え、氷上で1時間以上放置した。 放置後12,000rpm、5分間遠

心し、上清を除き70%エタノールで洗浄した。風乾後、2M LiCl溶液に溶かし氷上に10分間放置して15,000rpm、10分間遠心した。上清をエタノール沈澱し、洗浄、乾燥して30μlのTE bufferに溶かし塩基配列決定用DNA試料とした。なお、M13一本鎖DNAを用いた場合は2-2-5 3)の項に記した。

2)塩基配列の決定

塩基配列決定はSangerらの方法[63]に従った。反応には、7-deaza Sequenase TM Ver2.0for labeled dCTP(東洋紡)または7-DEAZA Sequencing Kit Ver.2.0(宝酒造)を使用し、[α-^{35}S]dCTP または[α-^{32}P]dCTPで標識した。その後、塩基配列決定用4M尿素-8%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。泳動後はゲルをゲルドライヤーと真空ポンプを用いて68～73℃、2時間吸引乾燥させてから、オートラジオグラフィーを行った。決定したDNA塩基配列の編集、解析にはソフトウェア開発(SDC)のコンピュータープログラムGenetyx Mを使用した。

2-2-18 その他

上記以外のDNA、RNAの取り扱いに関してはSambrookらの成書[54]に、大腸菌の取り扱いに関してはMillerの成書[64]に従って行った。

第3節　v-Ha-*ras*とハイブリダイズする染色体DNA断片の分離

シイタケFMC2株の染色体DNAを制限酵素*Eco*RI及び*Hin*dIIIで消化し、DNA消化物（各々20μg）をアガロースゲル電気泳動に供した。これらについて^{32}Pで標識した*CYR1*とv-Ha-*ras*をプローブとして弱い条件下でサザンブロット解析を行った。*CYR1*とハイブリダイズする明確なバンドは得られなかったが、v-Ha-*ras*とは*Eco*RI消化物では5.6kbと2.6kbの位置に、*Hin*dIII消化物では7.8kbと5.6kbの位置に明確なハイブリダイゼーションバンドが認められた。そこで、2.6kb付近の*Eco*RI断片と5.6kb付近の*Hin*dIII断片をアガロースゲルから回収し、pUC19ベクターにつないで染色体DNAライブラリーを作製し、このライブラリーから、^{32}Pで標識したv-Ha-*ras*をプローブとして用いたコロニーハイブリダイゼーションによって、v-Ha-*ras*とハイブリダイズする2.6kb*Eco*RI断片と5.6kb*Hin*dIII断片を単離した。さらに2.6kb*Eco*RI断片或は5.6kb*Hin*dIII断片をプローブとして、上記の*Eco*RI及び*Hin*dIII消化物の電気泳動物に対してサザンブロット解析を行ったところ、2.6kb*Eco*RI断片をプローブとした時は*Eco*RI消化物では2.6kb、*Hin*dIII消化物では7.8kbの位置にハイブリダイゼーションバンドが認められ、5.6kb*Hin*dIII断片をプローブとした時は*Eco*RI消化物で5.6kb、*Hin*dIII消化物で5.6kbの位置にハイブリダイゼーションバンドが認められた。この結果から、2.6kb*Eco*RI断片と5.6kb*Hin*dIII断片はv-Ha-*ras*とハイブリダイズする別個の塩基配列を持っていることが解った。続いて2.6kb*Eco*RI断片と5.6kb*Hin*dIII断片を各種の制限酵素で消化し制限酵素切断点地図を作成した（図2-1）。これをもとに5.6kb*Hin*dIII断片から、サブクローニングによってv-Ha-*ras*と相同性を示す1.2kb*Hin*dIII-*Xba*I断片を単離した。なおこの章では、5.6kb*Hin*dIII断片及び1.2kb*Hin*dIII-*Xba*I断片についての解析結果について述べ、2.6kb*Eco*RI断片については次章で述べることとする。

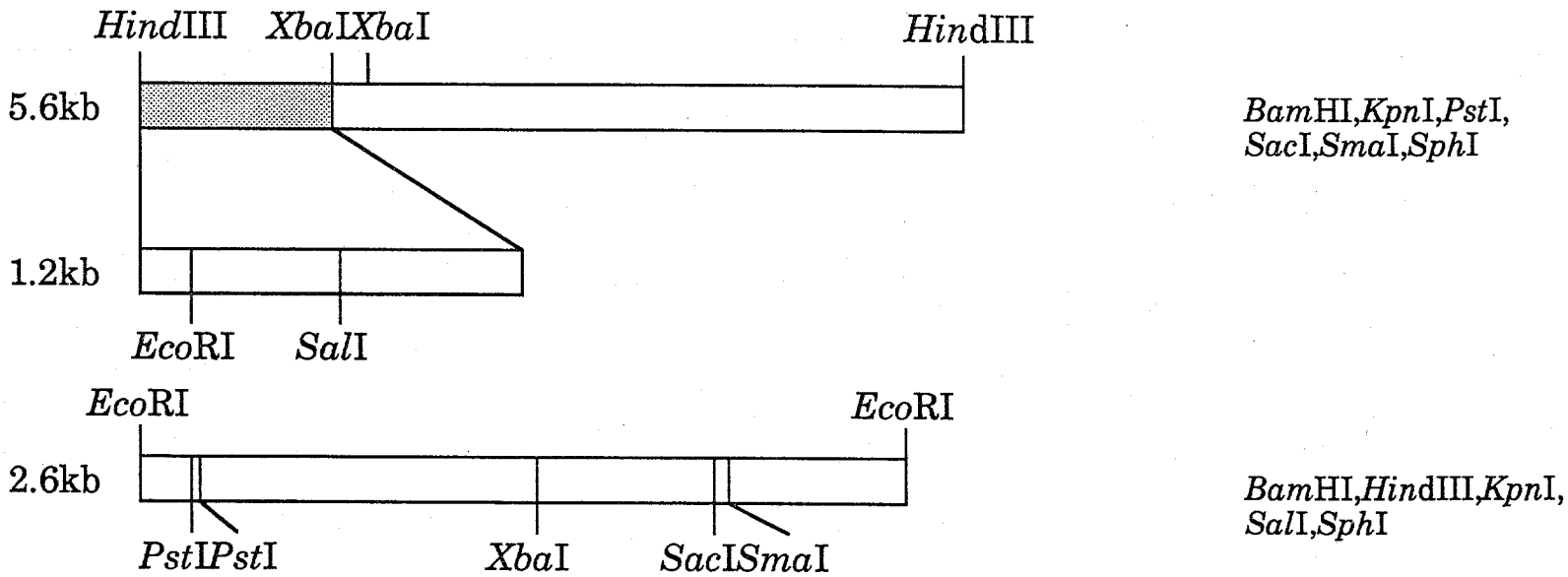


図2-1　v-Ha-*ras*とハイブリダイズした5.6kb*Hin*dIII断片と
2.6kb*Eco*RI断片の制限酵素切断点地図

5.6kb*Hin*dIII断片では、網かけで示した1.2kb*Hin*dIII-*Xba*I断片が
v-Ha-*ras*とハイブリダイズした。

第4節　*Le.ras*の塩基配列及び推定アミノ酸配列の決定

2-4-1　1.2kb*Hin*dIII-*Xba*I断片の塩基配列の解析

1.2kb*Hin*dIII-*Xba*I断片の塩基配列を決定し、塩基配列及びそれから予想される遺伝子産物のアミノ酸配列のホモロジー検索を行った。その結果、1.2kb*Hin*dIII-*Xba*I断片は既知の*ras*遺伝子と高いホモロジーを持ち、推定される*ras*相同遺伝子のほとんどの部分を含んでいて、またいくつかのイントロンによって分断されていることが示唆された。以後、この*ras*相同遺伝子を*Le.ras*と呼ぶことにする。

2-4-2　*Le.ras* 遺伝子の一次構造解析

*Le.ras*遺伝子の全一次構造を明かにするために、そのcDNAクローンの単離を行った。シイタケFMC2株の子実体原基より抽出した全RNAから、ポリ(A)$^+$RNAを精製し、それをもとにcDNAを合成した。first strand、second strandへのアイソトープ取り込み量より計算したcDNAの収率は42.5%であった。また、アルカリアガロースゲル電気泳動の結果から、合成されたcDNA大きさは約500bp～4Kbぐらいであることもわかった。合成したcDNA混合物をλgt10ベクターにつないだcDNAライブラリーを作製し、このcDNAライブラリーから、1.2Kb*Hin*dIII-*Xba*I 断片をプローブに用いて、プラークハイブリダイゼーション法により*Le.ras*cDNAの単離を試みた。その結果、約3万個のcDNAクローンから3個の有力な候補のcDNAクローンが得られた。これら3つのクローンは、各々1.2Kb、1.0Kb、2.4KbのcDNAを有しており、いずれのcDNAも1.2Kb *Hin*dIII-*Xba*I断片と強くハイブリダイズした。これらの断片に対して制限酵素切断点地図を作成したところ、1.0Kb断片は1.2Kb断片の一部が欠けたもの(おそらく　cDNA合成が完全に行われなかったと考えられる)であり、2.4Kb断片は1.2Kb断片のダイマーであった。以上、1.2kb断片が*Le.ras*cDNAであることが解った。

次に、*Le.ras*cDNAの全塩基配列を決定した（図2-2）。このcDNAは全長1,176

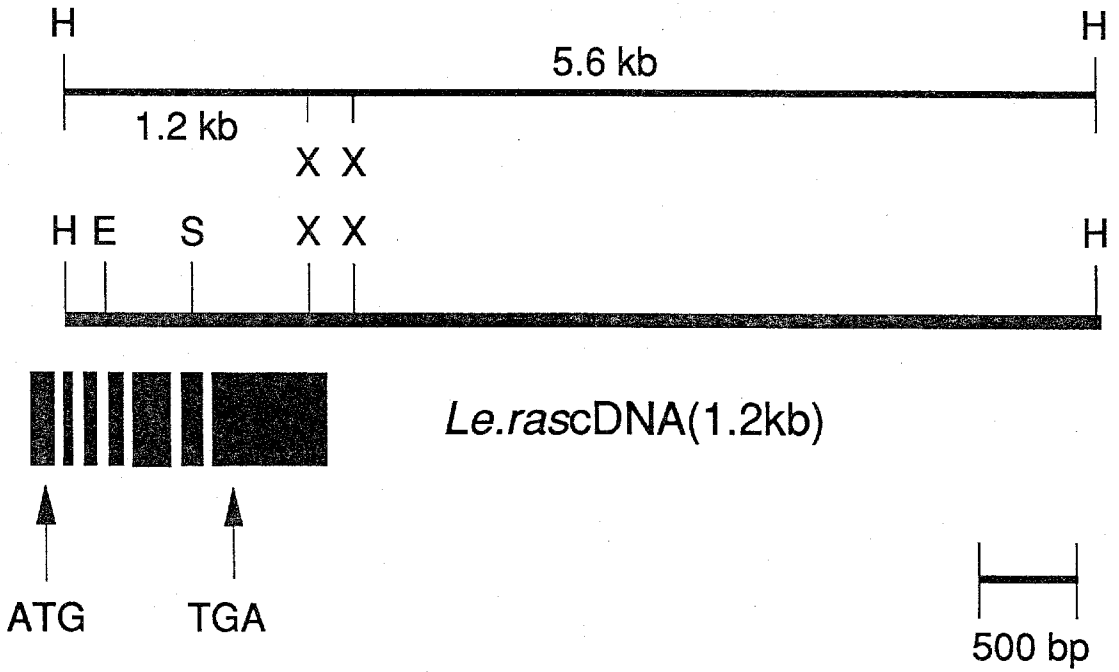


図2-2　*Le.ras*遺伝子とそのcDNAクローンの
制限酵素切断点地図

ATGとTGAはそれぞれ開始コドンと終止コドンを示す。黒四角は*Le.ras*のエキソンを示し、構造遺伝子は6つのイントロンによって分断されている。各種制限酵素は以下の文字で示してある。E: *Eco*RI,H: *Hin*dIII,S: *Sal*I,X: *Xba*I

bpであり、 種々のRasタンパク質に共通した構造的特徴をもつ、217個のアミノ酸から成るタンパク質をコードしていた。染色体DNA断片(1.2Kb *Hin*dIII-*Xba*I断片)と*Le.ras*cDNAとの塩基配列の比較から、*Le.ras*遺伝子の向きは、*Hin*dIII部位から*Xba*I部位方向で、 *Hin*dIII部位はアミノ末端から12番目と13番目のアミノ酸の位置に相当することが解った。 さらに、この染色体DNA断片で欠けている*Le.ras*のアミノ末端部分の構造を明らかにするため及び第４章で述べる*Le.ras*遺伝子の制御領域を単離するために、*Hin*dIII部位の上流約2.7Kbと1.2kb*Hin*dIII-*Xba*I断片に相当する配列とを含む約4Kbの*Xba*IDNA断片を新たに染色体DNAからクローニングし、全塩基配列を決定した（第４章　図4-1）。これによって欠けている*Le.*Rasタンパク質のアミノ末端部分の構造が解明された（図2-2）。図2-3に、 *Le.ras*遺伝子の塩基配列とその産物の推定アミノ酸配列を示した。染色体DNA断片とcDNAの塩基配列はお互いに完全に一致した。図2-3から明かなように、*Le.ras*遺伝子のコード領域は6個のイントロンによって分断されていた。これらのイントロンはそれぞれ 54,56,52,58,63,63bpの長さをもち、第2イントロンのドナー部位以外は全て、イントロンのGT-AG規則に従っていた。*Le.ras*遺伝子産物の分子量を計算したところ、24,007となった。

2-4-3　*Le.*Rasタンパク質と他のRas/RASタンパク質とのアミノ酸配列における比較

*Le.ras*と他の*ras*遺伝子との相同性を調べるため、*Le.*Rasタンパク質と他のRas/RASタンパク質のアミノ酸配列を比較した（図2-4）。ヒト/ラットのH-Ras-1[65]、出芽酵母の*Sc.*RAS1[66]と*Sc.*RAS2[67]、分裂酵母の*Sp.*RAS[68]、及び細胞性粘菌の*Dd.*Ras[39]と*Dd.*RasG[40]タンパク質は、 それぞれ189,309と322,219,186と189個のアミノ酸から構成されている。これらRasタンパク質の中で、*Sp.*RASタンパク質が分子量とアミノ酸配列の両方において、*Le.*Rasタンパク質に最も類似していた。両者はアミノ末端から80アミノ酸残基で86%の相同性を、続く80アミノ酸残基でも74%の相同性を示した。一方*Sc.*RAS1と*Sc.*RAS2タンパク質は、*Le.*Rasタンパク質に対して、 アミノ末端から80アミノ酸残基でともに83%、続く80アミノ酸残基でそれぞれ64%と59%の相同性を有していた。さらに、*Le.*Ras

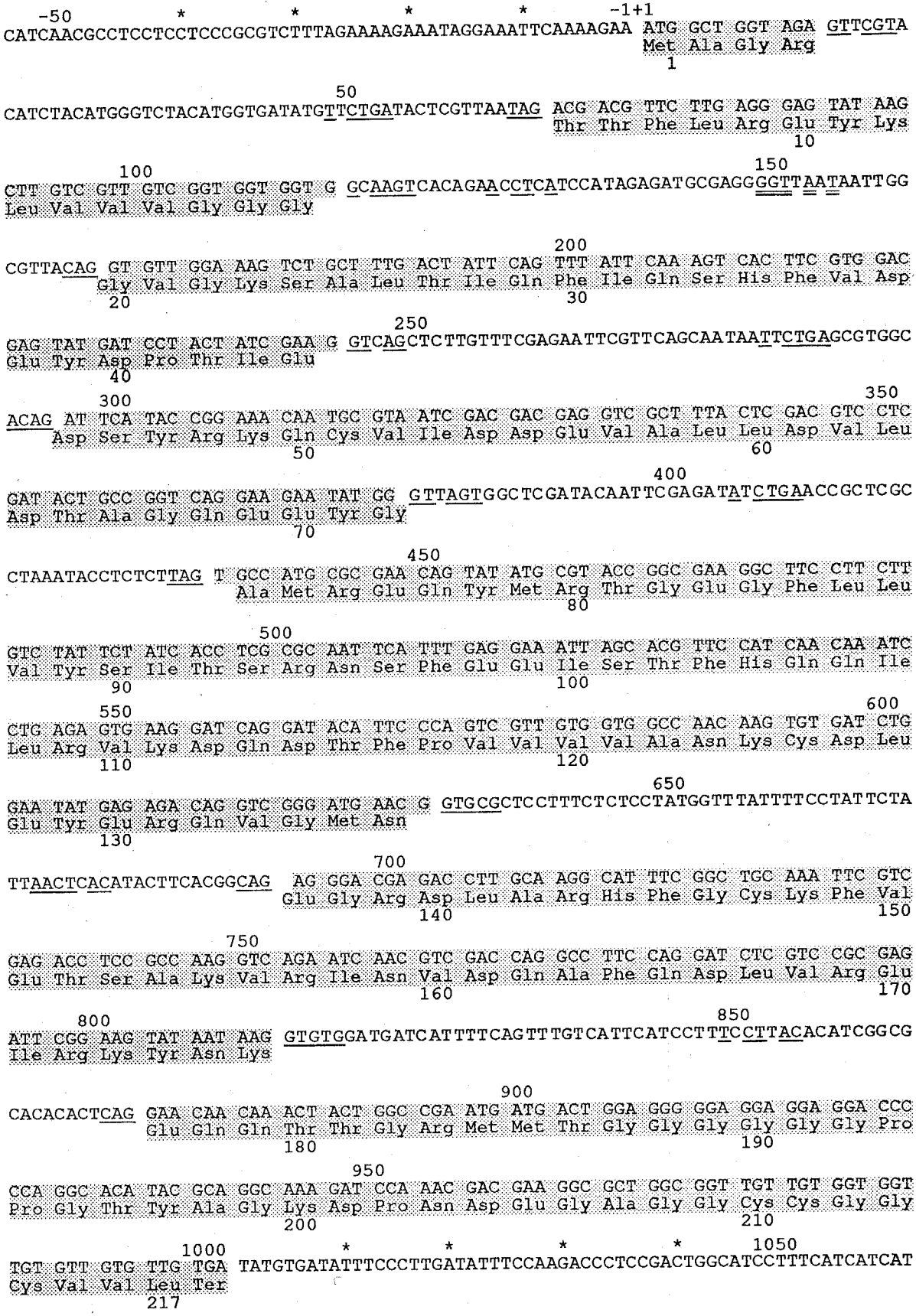


図2-3　*Le.ras*遺伝子の塩基配列とその推定アミノ酸配列

アミノ酸をコードする領域は網かけで示してある。イントロンは6つ存在した。真菌類のイントロンに見られるスプライシング共通配列は下線で、第2イントロンのスプライシングドナー共通配列様配列は二重下線で示してある。

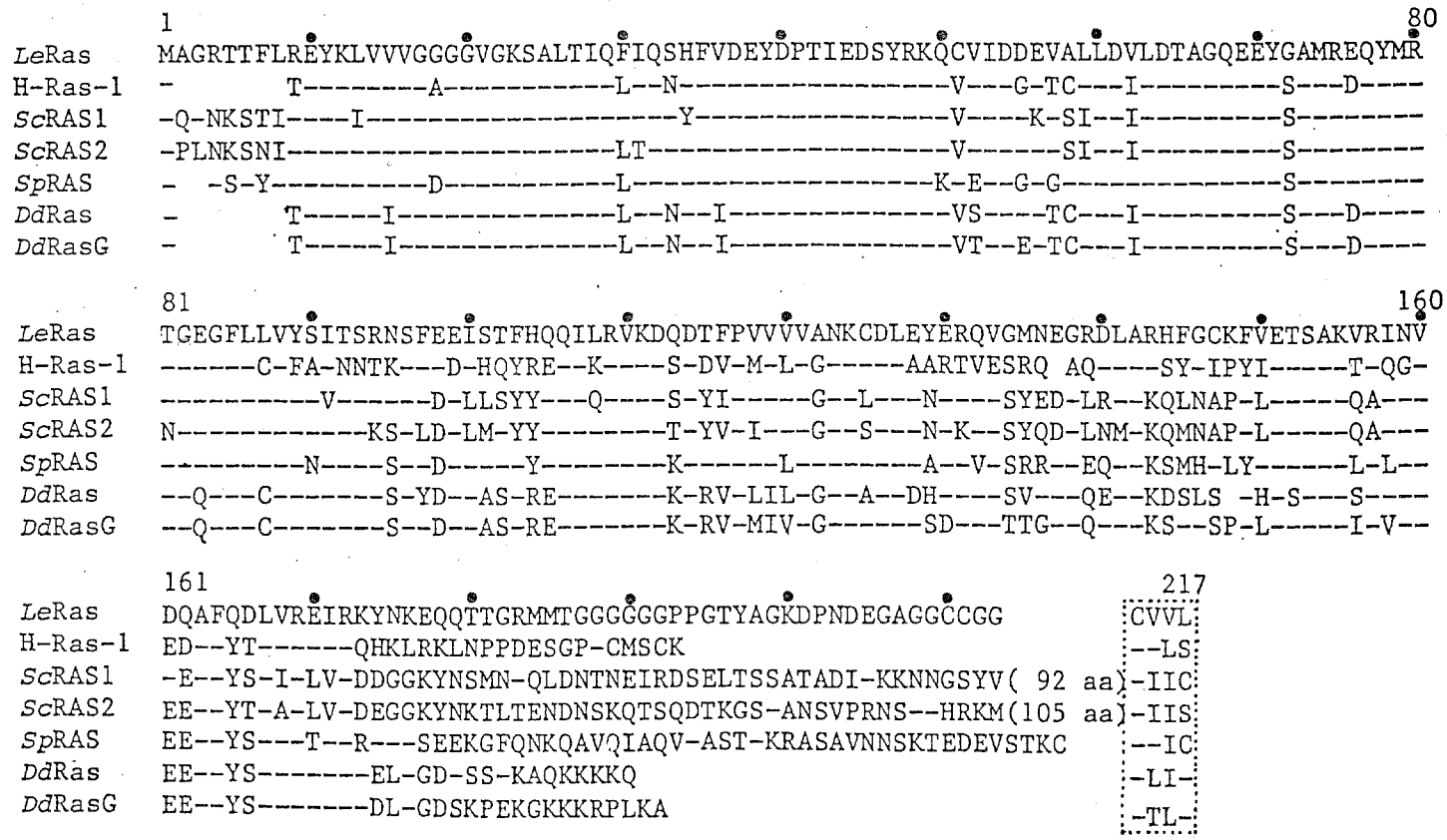


図2-4　*Le*.Rasタンパク質と他のRas/RASタンパク質とのアミノ酸配列における比較

アミノ酸配列は最も一致するように並べた。*Le*.Rasと同一のアミノ酸残基はダッシュで示してある。
出芽酵母(*S. cerevisiae*)のタンパク質では、C末端直前の92アミノ酸(*Sc*RAS1)及び105アミノ酸(*Sc*RAS2)は省略した。
C末端の破線で囲まれた部分はCys-A-A-X配列を示す。10アミノ酸残基毎に黒点を打ってある。

参考文献；ヒト／ラットH-Ras-1[65],*Sc*RAS1[66]&*Sc*RAS2[67],分裂酵母(*S.pombe*)*Sp*RAS[68],
細胞性粘菌(*D.discoideum*)*Dd*Ras[39]&*Dd*RasG[40]

タンパク質とH-Ras-1、*Dd.*Ras及び*Dd.*RasGタンパク質との相同性は、*Sc.*RAS1、*Sc.*RAS2が示した値よりも若干低いものであった。また、*Le.*Rasタンパク質は他のRas/RASタンパク質と同様に、Cys-A-A-X(A=脂肪族アミノ酸、X=任意のアミノ酸)という保存配列から成る特殊なカルボキシル末端構造を持っており、このCys残基がポリイソプレノイドとチオエーテル結合で結合することで細胞膜の内膜に結合していると示唆される[69]。

第5節　*ras*相同遺伝子の子実体形成過程における転写発現パターン

鋸屑・米糠培地で形成させた菌叢（菌糸塊）、子実体原基、成熟子実体から各々全RNAを調製し、この全RNAを各々20μgずつ使ってホルムアルデヒド変性アガロースゲル電気泳動を行い、塩基サイズごとに分離した。この分離パターンをナイロンメンブレンフィルターに移し、^{32}Pで標識した*Le.ras*cDNA(1.2kb)をプローブにしてノーザンブロット解析を行った（図2-5）。その結果、*Le.ras*遺伝子は子実体形成過程全般にわたって構成的に転写発現していることが解った（図2-5A）。同時に、前述の*Le.ras*を含む5.6kb*Hin*dIII染色体断片をプローブとしてノーザンブロット解析を行ったところ、子実体形成全過程でほぼ同じ強さの*Le.ras*シグナルの他に6.8kbの位置に特に成熟子実体で強いシグナルが観察された（図2-5B）。このことは、5.6kb*Hin*dIII断片上にはもう一つの遺伝子のおそらくその一部が存在していることを示唆する。これについては第6節考察で触れる。

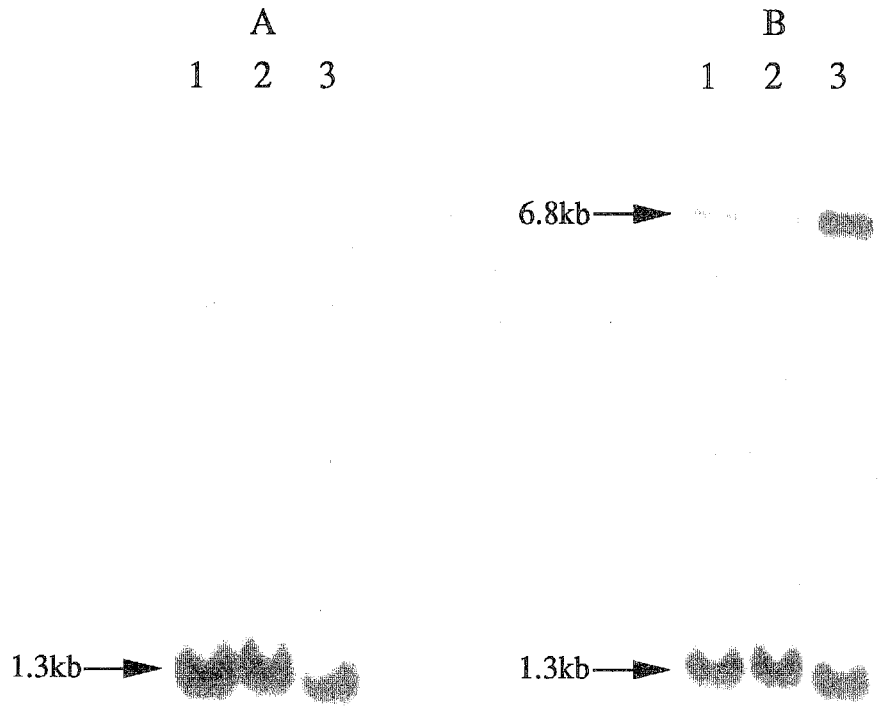


図2-5　*Le.ras*遺伝子の子実体形成過程における転写発現パターン

A:菌叢から抽出した全RNA(レーン1),子実体原基から抽出した全RNA(レーン2),成熟子実体から抽出した全RNA(レーン3)をそれぞれ電気泳動でサイズ毎に分け、ナイロンメンブレンフィルターに移し、ノーザンブロットを行った。プローブには1.2kbの*Le.ras*cDNAを用いた。

B:Aと同様に電気泳動してナイロンメンブレンフィルターに移した。そして*Le.ras*遺伝子を含む5.6kb*Hind*III断片をプローブとしてノーザンブロットを行った。

第6節　考察

この章では、担子菌シイタケFMC2株から*ras*相同遺伝子、*Le.ras*をクローニングし、その塩基配列と推定アミノ酸配列を決定すると共に、*Le.ras*遺伝子の子実体形成過程における転写発現パターンを解析した。*Le.ras*遺伝子は、217個のアミノ酸配列をコードしていて、その推定遺伝子産物*Le.*Rasは、他の既知のRas/RASタンパク質と高度の相同性があった。特に*Sp.*Rasとは、分子量やアミノ酸配列の両方で最も相同性が高かった。

Ras/RASタンパク質は、全て低分子量Gタンパク質であると考えられている。低分子量Gタンパク質は、GDPまたはGTPと特異的に結合し、また結合したGTPをGDPに分解するGTPase活性を有している。これらの活性を示す共通アミノ酸配列として、(1)Gly-X-X-X-X-Gly-Lys、(2)Asp-Thr-Ala-Gly、(3)Asn-Lys-X-Asp、(4)Glu-X-Ser-Ara-Xが高度に保存されている[70),71)]。*Le.*Rasタンパク質は、他のRas/RASタンパク質同様 (1)～(4)の配列がすべて保存されていることから低分子量Gタンパク質と考えられる。また*Le.*Rasタンパク質は、他のRas/RASタンパク質や細胞膜結合性タンパク質のC末端に存在する共通アミノ酸配列 Cys-A-A-X(Aは脂肪族アミノ酸、Xは任意のアミノ酸)を有している[72)]。*ras*p21では、Cys-A-A-X配列のシステイン残基ににイソプレノイドのひとつであるファルネシル基がチオエーテル結合で結合し、次にA-A-Xの部分がプロテアーゼにより除去され、続いてシステイン残基のカルボキシル基がメチル化されることが示されている[69)]。他方、同じ低分子量Gタンパク質である*smg*p21A、*smg*p21B、*rho*A p21等もCys-A-A-X配列を有しているが、システイン残基にはファルネシル基ではなく別種のイソプレノイドであるゲラニルゲラニル基がチオエーテル結合で結合していた[73)]。ゲラニルゲラニル基の修飾を受ける低分子量Gタンパク質のCys-A-A-X配列は、いずれの場合もXがロイシンまたはフェニルアラニンであることから、C末端側のアミノ酸配列がCys-A-A-Leu(Phe)である低分子量Gタンパク質は、システインにゲラニルゲラニル基が結合している可能性が高いと考えられている[74)]。そこで、*Le.*Rasタンパク質も上記の翻訳後修飾を受けるとすれば、そのC末端のアミノ酸がロイシンであることから、システイン残基には

ゲラニルゲラニル基が結合していることが示唆される。

さらに、H-*ras*p21やN-*ras*p21には、Cys-A-A-X配列の数残基N末端側にシステイン残基があり、これにパルミチン酸がチオエステル結合で結合することでタンパク質の膜結合性を強化していると考えられている。一方、Ki-*ras*p21には、Cys-A-A-X配列のN末端側にシステイン残基はなく、代わりにリジンに富んだ配列(polybasic region)が存在し、これが膜結合性を強化していると考えられている[69]。*Le.*Rasタンパク質もCys-A-A-X配列の3,4残基N末端側にシステイン残基が有るので、生体内ではこれらシステイン残基にパルミチン酸が結合していると示唆される。 *Le.ras*遺伝子のコード領域は、54,56,52,58,63,63bpの長さの 6つのイントロンによって分断されていた。これらのイントロン配列は、真菌類のイントロン共通配列 GTPuXGT---$^{A}/_{T}$PuCTPuAC---PyAG[75]とほぼ一致していた。また第2イントロンには、 スプライシングドナー保存配列AGGTPuAGT[76]に類似した配列GGTTAAATも認められた。

*Le.ras*遺伝子のノーザンブロット解析により、その転写発現は子実体形成過程全般で構成的に行われていることが解った。一方高木らによって、cAMP量は子実体形成初期に劇的に上昇することが報告されていることから、*Le.ras*遺伝子の転写段階とcAMP量とは相関性がなく、 序論で述べた細胞性粘菌での*ras*遺伝子とcAMP量の相関性とは異なると考えられる。また出芽酵母の場合のようにras遺伝子産物が直接的に cAMP生成系に係わっているということはなさそうである。 ところで、ノーザンブロット解析において、*Le.ras*遺伝子とは異なるハイブリダイゼーションバンドとして認められた 6.8kbのmRNAに対する遺伝子は、その転写発現が成熟子実体(mature fruiting body)時で特に盛んであることから、*mfbA*と命名した。その後当研究室において、*mfbA*遺伝子のcDNAが単離され、その塩基配列及び推定アミノ酸配列が決定された[77]。それによると、*mfbA*遺伝子産物(MFBA)は、細胞接着に必要なドメインとしてフィブロネクチン等から見つけ出されたRGD配列を有することが解っていて、 現在更なる解析が行われている。

第３章　形態分化関連遺伝子*priA*及び*priB*の単離と遺伝子解析

第1節　序論

緒論にも述べたように、これまでの真菌類における代表的な形態分化である子実体形成に関する研究は、子実体形成誘導物質に関する研究が多数を占め、子実体形成に関連する遺伝子の研究はほとんど報告されていなかった。唯一、子実体形成に関連する遺伝子として、 Wesselsらのグループがスエヒロタケより子実体形成が可能な二次菌糸で特異的に転写発現する遺伝子 *Sc1*, *Sc4*をクローニングした[78]。*Sc1*, *Sc4*遺伝子の転写発現は、接合遺伝子や CO_2濃度、光等の外部環境因子によって直接的或いは間接的にコントロールされていて[79),80)]、それらの転写産物は、子実体形成直前の二次菌糸で各々全mRNA量の 0.5%, 3.5%まで達すると報告されている[81)]。

この章では、前章で癌遺伝子*v-Ha-ras*に部分的な相同性を有するとして単離された2.6kb*Eco*RI断片を解析し、その断片に含まれる子実体形成に関連すると予想される遺伝子(*priA*)を単離し塩基配列を決定した。さらにこの遺伝子の子実体形成過程における転写発現パターンを詳細に解析し、子実体原基時（子実体形成初期）との関連性を示した。次に、当研究室の遠藤が子実体原基時で多量に発現しているmRNAから単離した遺伝子(*priB*)についてその塩基配列を確定した。次いで*priA*と*priB*両遺伝子についてそれらの推定遺伝子産物の構造特性を解析した。

第2節　材料と方法

3-2-1　菌株

この章での実験に使用したシイタケ(*L. edodes*)と大腸菌(*E. coli*)の菌株、遺伝子型は表3-1に示した。

表3-1　使用菌株

Strains	Genotype	Reference
L. edodes		
FMC2	Wild Type	48)
E. coli		
JM109	F' *traD36 proA*$^{+}$ *proB*$^{+}$ *lacI*^{q} *lacZ*Δ *M15/recA1 endA1 gyrA96* (Nal^{r}) *thi hsdR17 supE44 relA1* Δ *(lac-proAB) mcrA*	49)
C600	*thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21 supE44 mcrA*	50)
C600Hfl	*thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21 supE44 mcrA hflA150 chr*::Tn*10*(*tet*^{r})	51)

3-2-2　プラスミド及びファージDNA

この章での実験に使用した大腸菌プラスミド及びファージDNAは表3-2に示した。

表3-2　プラスミド及びファージDNA

Vector	Size(kb)	Genetic Marker	Source or Reference
Plasmid			
pUC18	2.7	Amp^r lacZ	49)
pUC19	2.7	Amp^r lacZ	49)
Bacteriophage			
λgt10	43.3	cI	52)
M13mp18	7.3	lacZ	49)
M13mp19	7.3	lacZ	49)

3-2-3　ハイブリダイゼーションのプローブ除去

沸騰させた0.1%ＳＤＳ溶液にハイブリダイゼーション後のフィルターを浸し、そのまま室温に下がるまで放置した。フィルターはオートラジオグラフィーでプローブが除去されたことを確認してから、再利用した。

3-2-4　塩基配列決定法

塩基配列決定はSangerらの方法[63]に従った。実験方法としては、ラジオアイソトープを標識として用いる方法と蛍光標識及び PCRを用いる方法の両方で行った。ラジオアイソトープを標識として用いる方法には、 7-deaza Sequenase ™ Ver2.0for labeled dCTP(東洋紡)または7-DEAZA Sequencing Kit Ver.2.0 (宝酒造)を使用し、[α-^{35}S]dCTP または[α-^{32}P]dCTPで標識した。 その後、塩基配列決定用8% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。 泳動後はゲルをゲルドライヤーと真空ポンプを用いて 68～73℃、2時間吸引乾燥させてから、オートラジオグラフィーを行った。他方、蛍光標識及びPCRを用いる方法は、Taq Dye Primer Cycle Sequencing Core Kit (Applied Biosystems)を使用し、そのプロトコールを基に反応を行い、サンプルを調製した。サンプルはABI 370A DNAシーケンサー(Applied Biosystems)で電気泳動し、同時に解析を行った。決定したDNA塩基配列の編集、解析にはソフトウェア開発(SDC)のコンピュータープログラムGenetyx Ⅵを使用した。

3-2-5　データベースを利用しての塩基配列及びアミノ酸配列の検索

塩基配列はデータベースGenBankに対して、アミノ酸配列はNBRF-PIRプロテインシーケンスデータベースに対してそれぞれ検索を行った。

3-2-6　その他

上記以外の材料と方法は、前章の第2節に示したものに従って行った。

第3節　priAの単離と塩基配列の決定

制限酵素切断点地図（図2-1）をもとに 2.6kb*Eco*RI断片の塩基配列の決定を行った。その結果、2.6kb*Eco*RI断片中の1.2kb*Pst*I-*Xba*I断片には、約500bpに亘ってv-Ha-*ras*遺伝子と42%ぐらいの低い相同性が認められたが、2.6kb*Eco*RI断片の塩基配列から予想されるアミノ酸配列には Ras/RASタンパク質と相同性がなく、別種のタンパク質であることが示唆された。また図3-3に示すように、この断片上の遺伝子が子実体原基(primordium)時に高程度に発現することから、この遺伝子を*priA*と命名した。さらに2.6kb*Eco*RI断片をプローブに用い、前章で作製したcDNAライブラリーから2.6kb*Eco*RI断片とハイブリダイズする1.3kbcDNA断片，*priA*cDNAを単離し、その全塩基配列を決定した。2.6kb*Eco*RI断片中の遺伝子と*priA*cDNAの塩基配列は完全に一致し、*priA*cDNAには3'末端に存在するpoly(A)尾部が有り、遺伝子の方向も確認できた（図3-1）。*priA*の全塩基配列を図3-2に示す。*priA*構造遺伝子は、52bpと56bpの2つのイントロンによって分断されていて、これらイントロンには真菌類のイントロンに見られるスプライシング共通配列 GTPuXGT---$^{A}/_{T}$PuCTPuAC---PyAG[75]とほぼ一致する配列が見られた。またデータベース GenBankに対して*priA*遺伝子に類似する遺伝子の検索を行ったが、類似性を示す遺伝子は一つも見つからず*priA*は新規の遺伝子であると考えられる。この点に関する詳細は第6節で述べる。 *priA*遺伝子のコドン使用頻度は、バイアスが緩く64のコドン中で55のコドンを使用していた。推定される*priA*遺伝子産物(PRIA)は、258個のアミノ酸から構成されていて、 その分子量は26,734と考えられる。またPRIAは、セリン（42残基）、プロリン（29残基）、スレオニン（27残基）に富んでおり、C末端には *Le.*Rasタンパク質にも認められた膜結合性タンパク質に存在するCys-A-A-X配列（Aは脂肪族アミノ酸、Xは任意のアミノ酸）が認められた。Xのアミノ酸がロイシンであることから、*Le.*Rasタンパク質と同様にシステイン残基にはゲラニルゲラニル基が結合すると予想されるが、システイン残基のすぐ N末端側にはシステイン残基またはpolybasic regionは認められず、膜結合性の強化は行われていないと考えられる。

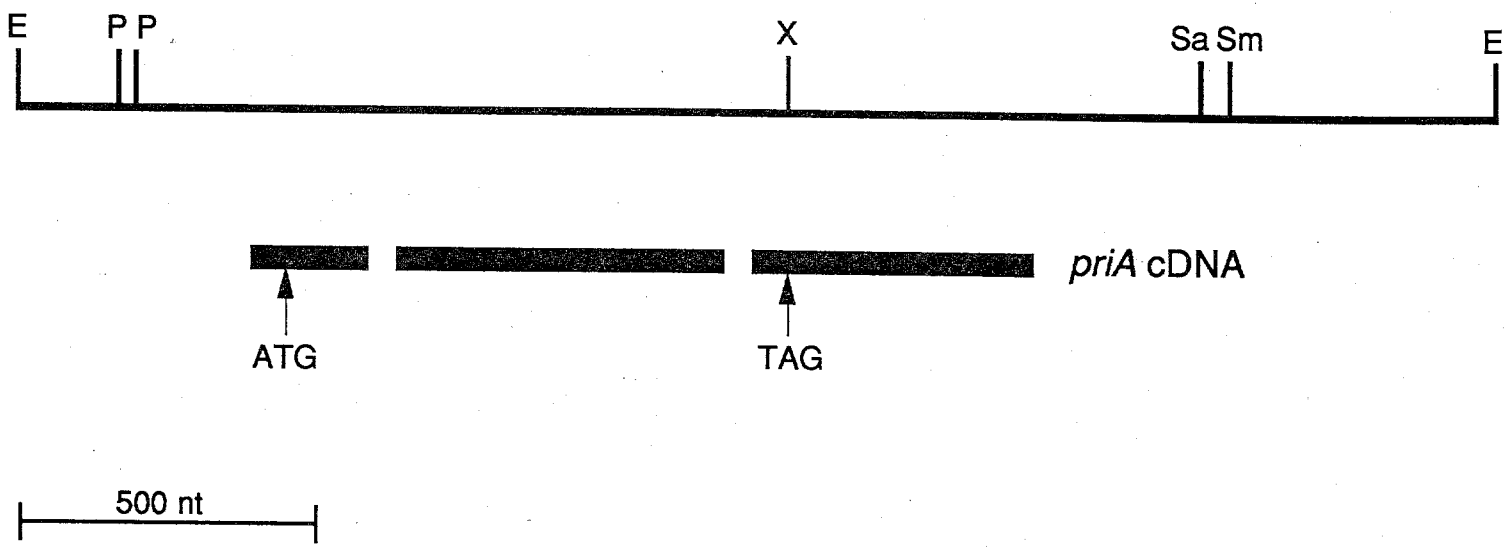


図3-1　*priA*遺伝子とそのcDNAクローンの制限酵素切断点地図

ATGとTGAはそれぞれ開始コドンと終止コドンを示す。黒長四角は*priA*のエキソンを示し、構造遺伝子は2つのイントロンによって分断されている。各種制限酵素認識部位は以下の文字で示してある。E:*Eco*RI,P:*Pst*I,Sa:*Sac*I,Sm:*Sma*I,X:*Xba*I

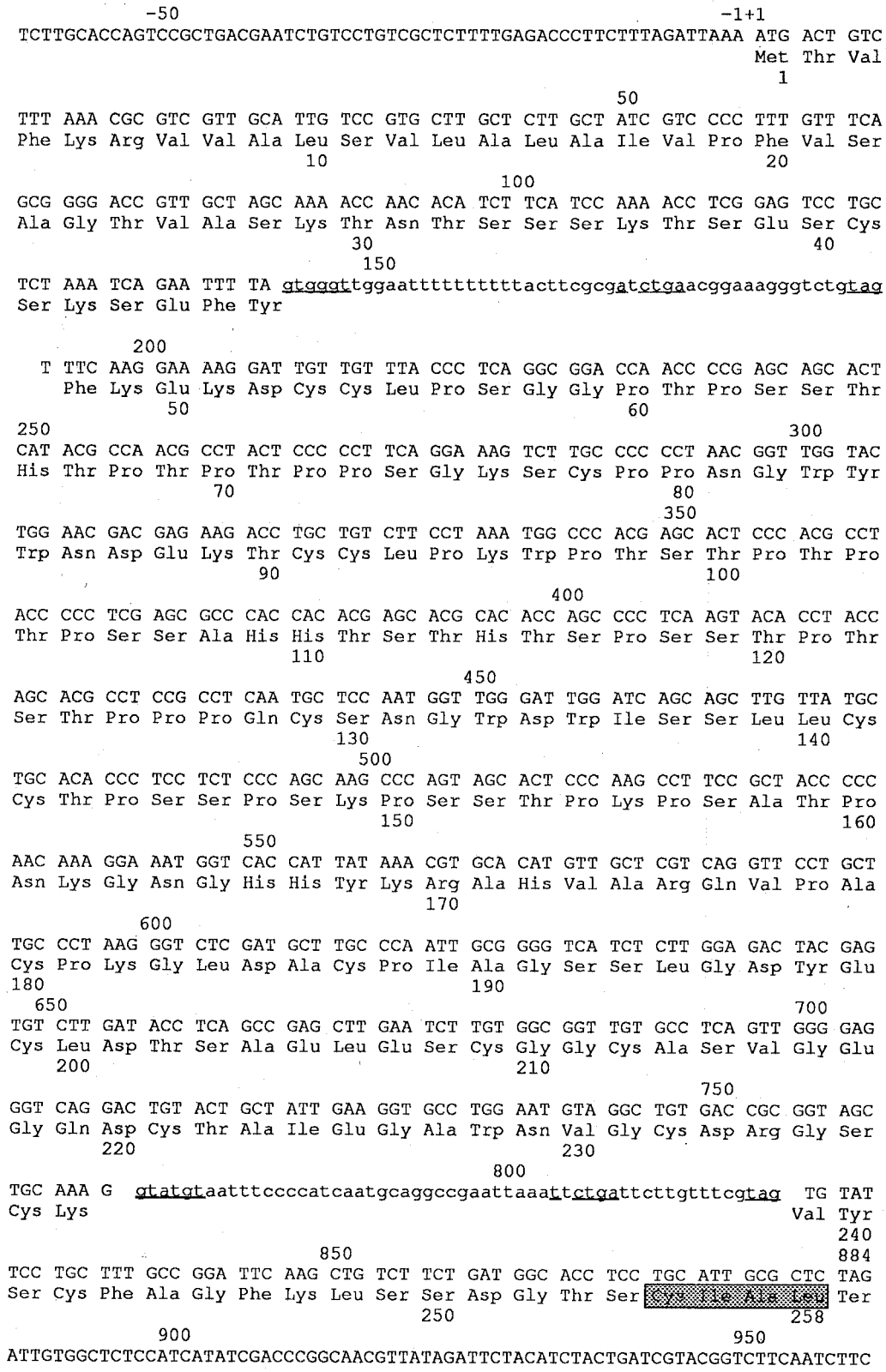


図3-2 *priA*遺伝子の塩基配列とその産物の推定アミノ酸配列

塩基配列番号は翻訳開始コドンのAを+1とし、アミノ酸配列番号は開始コドンのメチオニン(Met)を1として表してある。イントロン部分は小文字で示してある。真菌類のスプライシング共通配列は下線で示してある。膜結合性のc末端共通アミノ酸配列Cys-A-A-Xは網かけの四角で囲んで示してある。

第4節　*priA*の子実体形成過程における転写発現パターン

*Le.ras*遺伝子と同様、*priA*遺伝子の子実体形成過程における転写発現パターンを解析した。*Le.ras*遺伝子をプローブとしたシイタケFMC2株の菌糸塊、子実体原基、成熟子実体の全RNAに対するノーザンブロット解析で使用したナイロンメンブレンフィルターからプローブを完全に除去し、*priA*遺伝子が含まれている2.6kb*Eco*RI断片をプローブにして、再度ノーザンブロット解析を行った（図3-3）。解析結果を*Le.ras*遺伝子のものと比較したところ、*Le.ras*遺伝子は前述したように子実体形成過程全般で構成的に転写発現していたのに対し（図3-3B）、*priA*遺伝子は子実体原基時に多量の転写発現が認められ、菌糸塊時や成熟子実体時では低度の転写発現であった（図3-3A）。同様の結果は*priA* cDNAをプローブとした場合にも得られた。これらのことは、*priA*遺伝子が子実体形成初期において何らかの役割を果たしていることを示唆するものである。

第5節　*priB*cDNAの塩基配列の確定と*priB*の子実体形成過程における転写発現パターン

当研究室の遠藤が、Hybrid subtraction法[82)]（図3-4）を用いて子実体原基時で多量に転写発現されるmRNAを濃縮し、そのcDNAライブラリーから2.7kb、2.5kb、2.3kbの3つのcDNAクローンを単離し、その内の1つである2.7kbのcDNAを*priB*cDNAと命名してその塩基配列の決定を行っている。ここでは、*priB*cDNAの塩基配列の確定を行うと共に、*priB*遺伝子の子実体形成過程における転写発現パターンの解析を行った。

図3-5に*priB*cDNAの全塩基配列を示した。遺伝子の方向性は*priB*cDNAにpoly(A)尾部が見い出されたことから判断できた。推定される*priB*遺伝子産物は、565個のアミノ酸から構成されており、分子量は約64,000であった（図3-5）。また*priB*cDNAの塩基配列に対するコドンの使用頻度は、バイアスがかなり緩く、64のコドン中で61のコドンを使用していた。さらに、*priB*cDNA中の構造遺伝子より下流に真核生物のプロモーターに類似したモジュールが認められた（図3-5）。翻訳開始コドンATGのAを+1として数えた時の1977～2285bpに亘ってGCbox,

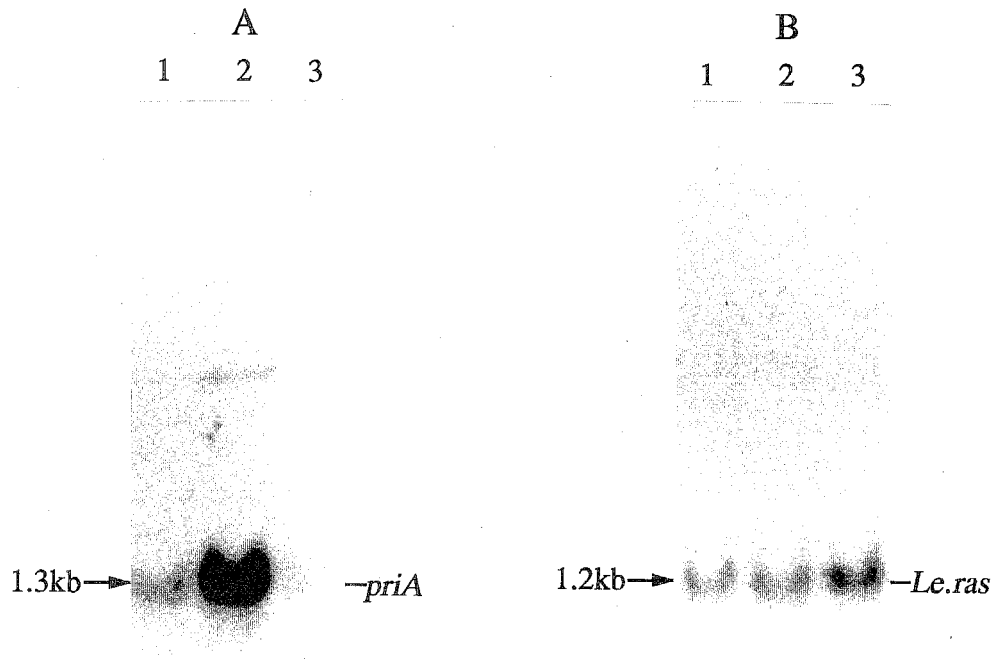


図3-3　priA及びLe.ras遺伝子の子実体形成過程における転写発現パターン

Bの実験を行い、次にAの実験を行った。
B:菌叢から抽出した全RNA(レーン1),子実体原基から抽出した全RNA(レーン2),成熟子実体から抽出した全RNA(レーン3)をそれぞれ電気泳動でサイズ毎に分け、ナイロンメンブレンフィルターに移し、ノーザンブロットを行った。プローブには*Le.ras*cDNAを用いた。
A:Bのフィルターからプローブを完全に除去し、1.2kbの*priA*遺伝子の2.6kb*Eco*RI断片をプローブとしてノーザンブロットを行った。

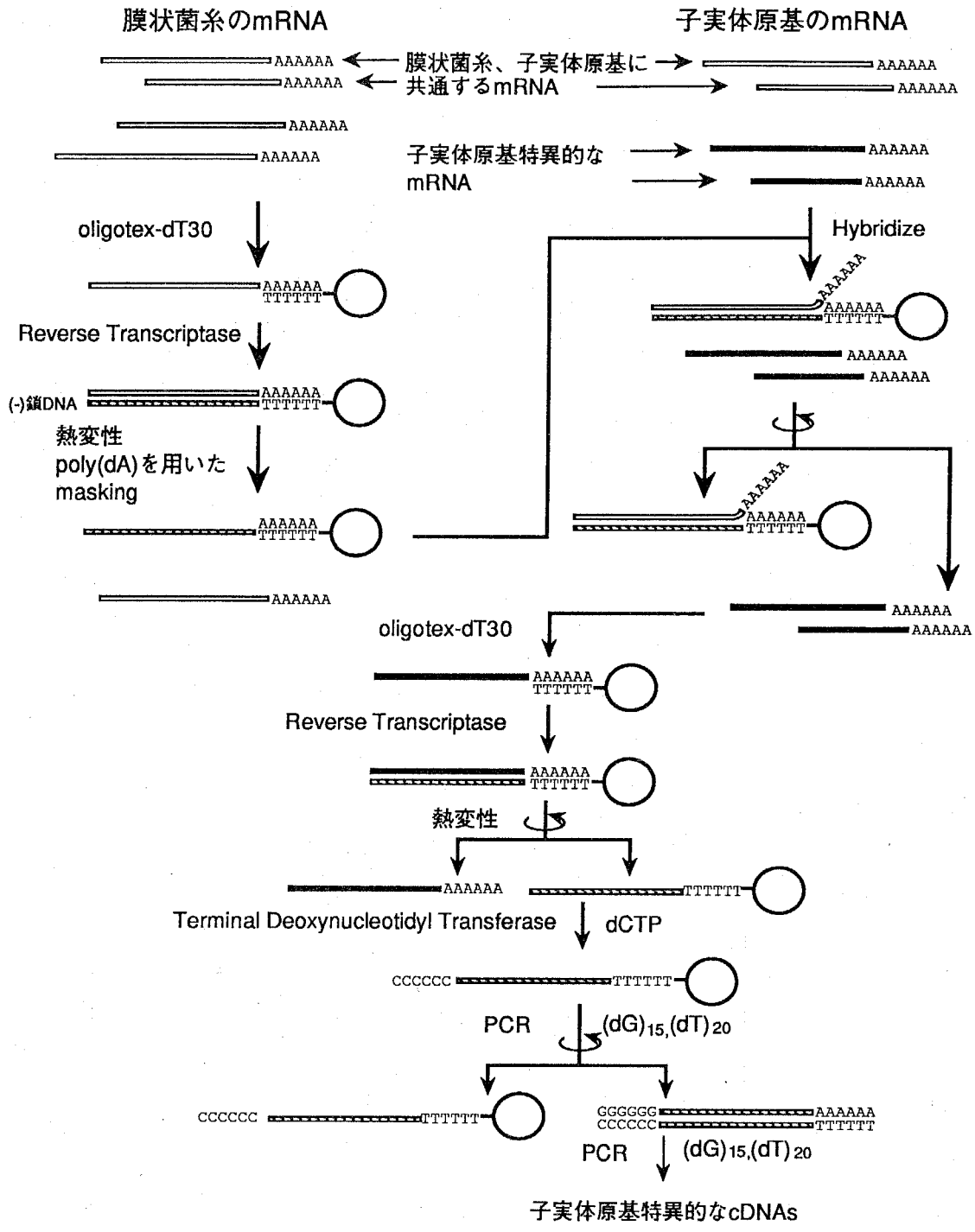


図3-4　Hybrid subtraction法を用いた子実体原基特異的なcDNAsの分離方法の概略図

参考文献 宮本力:Hybrid subtractionを利用したDifference Cloning法　BIO media,5(11),1170-1174,1990
大田恵子、宮本力、古市泰宏:Oligotex-dT30を利用したmRNAのHybrid subtraction　蛋白質　核酸　酵素 35(13),2257-2265,1990

```
-240                                                                  GGA

-237 ATTCCGATTTATCAAAAGCCCGTGCATCCTTCAAAAGCCGAGGTTGGATCATCAGCTTGTCCATTATTTAAAGCTGCCA

-158 TCTTTCCCTCTAACCTTTCACTGCTCTGCTCTCACTCTTGTGCAGTTGGCTCTCCCTCGTTTCTCCTCTGAGACCCGAT

 -79 TGTTAAAACCGGGCTCGTTTACACCTGGTTTACACGTCGCGTATTCTTTGATCACCGTCATCTGAAGACCGGCAAATAA

   1 ATG GAA GTC CAT GCT GAA CAA TTA CAA AAG CCC CCC GTT GTC CGT GGT GCC CGA GCA TGT
     Met Glu Val His Ala Glu Gln Leu Gln Lys Pro Pro Val Val Arg Gly Ala Arg Ala Cys  20

  61 ACG ACG TGC CGT GCA GCA AAG ATG AAA TGC GTC GGA GCT GAG GAT GGA CAA AGA CAG TGC
     Thr Thr Cys Arg Ala Ala Lys Met Lys Cys Val Gly Ala Glu Asp Gly Gln Arg Gln Cys  40

 121 CAG CGT TGC AAG CGT GCA AAC GTC CAA TGC ATT TTT GAG AAA CAT CGT CGA GGC CGC AAA
     Gln Arg Cys Lys Arg Ala Asn Val Gln Cys Ile Phe Glu Lys His Arg Arg Gly Arg Lys  60

 181 CCA GGC TCC AAG CTT TCG GAA GCT TCC AAA ATG TTA CGA CGT TTG GAG AAG GGT CTC AAT
     Pro Gly Ser Lys Leu Ser Glu Ala Ser Lys Met Leu Arg Arg Arg Glu Lys Gly Leu Asn  80

 241 AGT GCC AAA TCC AAA GCT TTC TCT ATA GAC GCA AGA CAT TCA TCC TCG TAT CGA GAC TCG
     Ser Ala Lys Ser Lys Ala Phe Ser Ser Asp Ala Arg His Ser Ser Ser Tyr Arg Asp Ser 100

 301 CAT CCG TCT CTT GGT GAG CCA GAT GAC CGT TAT ACC AAC GGT GTC CGT AGT CAT CCC TAC
     His Pro Ser Leu Gly Glu Pro Asp Asp Arg Tyr Thr Asn Gly Val Arg Ser His Pro Tyr 120

 361 AGC CCT CCA AAT GGG CAA TTC GTT TCA AAT CTA CCA CCT CTC AAT CTC CCT TCC TAT CCT
     Ser Pro Pro Asn Gly Gln Phe Val Ser Asn Leu Pro Pro Leu Asn Leu Pro Ser Tyr Pro 140

 421 GAT GCT GCC AGC GAA TAC ACT GCA TCT AGT ACA AGC TCT CGT ACC TTG GAC GCG AAT GAT
     Asp Ala Ala Ser Glu Tyr Thr Ala Ser Ser Thr Ser Ser Arg Thr Leu Asp Ala Asn Asp 160

 481 GAT GAA GGC GAC AGT GCG TCC GAT CGC GCA GAG GAT AAC ATT TTC CCG GCC AAC TTT ATT
     Asp Glu Gly Asp Ser Ala Ser Asp Arg Ala Glu Asp Asn Ile Phe Pro Ala Asn Phe Ile 180

 541 CAG CGG GAG CGT AGA CGA AAT TCC TTC TTT AGA ACA ATA CTC AAT CCT GAA GAC GCT CCT
     Gln Arg Glu Arg Arg Arg Asn Ser Phe Phe Arg Thr Ile Leu Asn Pro Glu Asp Ala Pro 200

 601 GCC TCA GGA CCA TCT TCT GTC CGT TGC TCT GAG ACG TAC AGC CCT CCT CAA TCT CCT GCC
     Ala Ser Gly Pro Ser Ser Val Arg Cys Ser Glu Thr Tyr Ser Pro Pro Gln Ser Pro Ala 220

 661 GCT CCT GCC GGT CTT AAC GAC CCC GTA TCA GCC GGT ATT GTG GAT GAA GAG CAT GCC AAA
     Ala Pro Ala Gly Leu Asn Asp Pro Val Ser Ala Gly Ile Val Asp Glu Glu His Ala Lys 240

 721 GTT CTA TTT GAT CTG ATC TTC CTT CGT CTT AAT CCC TTC ATC AAT CTT TTT GAT CCC TCT
     Val Leu Phe Asp Leu Ile Phe Leu Arg Leu Asn Pro Phe Ile Asn Leu Phe Asp Pro Ser 260

 781 CTG CAT ACA GTT TCA TAT GTT AGG AAC AAA TCG CCG TTT TTG TTC ACT GTC TTG ATA ATG
     Leu His Thr Val Ser Tyr Val Arg Asn Lys Ser Pro Phe Leu Phe Thr Val Leu Ile Met 280

 841 GCC GGC TGT AAA TTC TTC AGG CCG GAA CTC TTC AAG CAG TGC CAG AAA CTT GCG GAC GAA
     Ala Gly Cys Lys Phe Phe Arg Pro Glu Leu Phe Lys Gln Cys Gln Lys Leu Ala Asp Glu 300

 901 TAT GCT GTC CAA GCT TTT GCG TGC CTT ACT TAC TGG AAA GGC CAC GAT GAC AAT CGT ACG
     Tyr Ala Val Gln Ala Phe Ala Cys Leu Thr Tyr Trp Lys Gly His Asp Asp Asn Arg Thr 320

 961 AGT ACC TGG ACC TTT GTA GGT TAT GCA TGC CGA ATG CGT GTG GAG ATC GGT CTC AAT CGC
     Ser Thr Trp Thr Phe Val Gly Tyr Ala Cys Arg Met Arg Val Glu Ile Gly Leu Asn Arg 340

1021 TAT GTC CCC AAT GTT CCG TCC AAT GAA ACC GAA CTA CAA CGA TTG GAG CGT CGT AAT CGA
     Tyr Val Pro Asn Val Pro Ser Asn Glu Thr Glu Leu Gln Arg Leu Glu Arg Arg Asn Arg 360

1081 GAA AGA ACT TAT CTT GTT CTT TTC ATC CAT GAT CGC AGC CTC AGC ACC CAG ACG GGT CGC
     Glu Arg Thr Tyr Leu Val Leu Phe Ile His Asp Arg Ser Leu Ser Thr Gln Thr Gly Arg 380

1141 CAC TGG ATG CTT CCC GAG GAT GAC TTT ATT CGA CAT TCC GAT AGA TGG CAC GAA AGT TCC
     His Trp Met Leu Pro Glu Asp Asp Phe Ile Arg His Ser Asp Arg Trp His Glu Ser Ser 400

1201 GGA GGT TCT GTT CGA CCG GAA GAC GTT ATT GTG GCT GCT TTC GTG CAA TTG CGG CAC ATT
     Gly Gly Ser Val Arg Pro Glu Asp Val Ile Val Ala Ala Phe Val Gln Leu Arg His Ile 420

1261 GCT GCT GAA ACG ACA GAG ATA TTC CAA AGA GGT GTT GAC ATG AGT TCT GAA GTT GTA CTA
     Ala Ala Glu Thr Thr Glu Ile Phe Gln Arg Gly Val Asp Met Ser Ser Glu Val Val Leu 440

1321 CGT AGC TGC AAC AGT CAG CTA ACC CAA TGG AAT GAA ACC TGG CAT CGA GAG ATG CAA CAA
     Arg Ser Cys Asn Ser Gln Leu Thr Gln Trp Asn Glu Thr Trp His Arg Glu Met Gln Gln 460

1381 GCG GGA GGA GGT GCC TTC CAT TTT TCG TTC CTT AGT CTG TTT CGG TTA TAC GTT CGA TTG
     Ala Gly Gly Gly Ala Phe His Phe Ser Phe Leu Ser Leu Phe Arg Leu Tyr Val Arg Leu 480

1441 TTC ACT AAC AGC CTT GCA CTT CGA GAA TCG TCC AAT CGA GCT ACT CCG AAC ATT CAA GCT
     Phe Thr Asn Ser Leu Ala Leu Arg Glu Ser Ser Asn Arg Ala Thr Pro Asn Ile Gln Ala 500

1501 CTT TCA GCA TGT TAT ACG AGT GCC GTT GAT TCC CTG AAA GTC GTC TCG GAA TTT GCT AGA
     Leu Ser Ala Cys Tyr Thr Ser Ala Val Asp Ser Leu Lys Val Val Ser Glu Phe Ala Arg 520

1561 ATG AAT GTA TTG CGC TAT GGA CAG GAG ACT ATC ACA ATG ATG TCC GCA TAT GCC GCA CTA
     Met Asn Val Leu Arg Tyr Gly Gln Glu Thr Ile Thr Met Met Ser Ala Tyr Ala Ala Leu 540

1621 TAT TTA TTA AGC CTA CTC CGC AAT ACA CTT CGT TAC TGC AGC TGC ACG ATG GCG CAA CTC
     Tyr Leu Leu Ser Leu Leu Arg Asn Thr Leu Arg Tyr Cys Ser Cys Thr Met Ala Gln Leu 560

1681 AAA ATG CGT ATA CTG TGATTCAACAAACAGCGGAAGCGTACCATGAAGCATCTCCATCGGCGGCATATCACGCC
     Lys Met Arg Ile Leu ***                                                      565

1755 CGCTTTCTGAAAGGACTCGCCCATGACATCTTTAGATACCGGAGCATCGAGAAATCTACCGGTGCTGTGCGTTCTCCAG

1834 ATAGCCGTTCACAAGGTCCACAGCCCGAAATACAAAGGCCAGCACATTCATCAGCTTCTCCCTTCTATGCACCGCTGTC

1913 TAGCCAATTCTCAGGTTTCCCATTACCCCCCTGACCAATTTCTGGCATCTCCTCCTCCTTCGCATTGTTCCGTGTGTCGT

1992 GAAAGTGAATATTCAGAATCGCTCGCGTTATCATCTTTACCTTCTTTTCTTCCAGCTCATGTGGGTGGGGTTCATATGC

2071 CTGCTGCACCGACGCATTTTTCGGAGCCGGATCAGCAATACTGGCGGAAGATTTACTTAGACCTGGGTGGCATGGAGGG

2150 ACTGACACCAATGGGGATGTGATGTCCTTTGGTAGTTCCACCAGTATTGCTAATTCTGTCTGCAAACATTCAAGATTCT

2229 TGTTGAAATCGTGTACATTGATCTGTGTACTTTTATCCATTCTACGACTTTACGACCTCTAAGTAGTCTAGGTCTAAGG

2308 TTTTGTTTTGATATCCATATACAGTTTACATTAAGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

2389 AAAAAAAAAAGGAATTCC
```

図3-5 *priB*の塩基配列と推定アミノ酸配列

Znクラスターモチーフは四角で囲んで示してある。塩基性アミノ酸に富む領域は破線で示してある。7塩基おきに存在するロイシン及びアラニン残基(疎水性アミノ酸)の繰り返しは白抜き及び網かけの楕円で示してある。下流側に存在するプロモーター様モジュールは網かけの四角で示してある。左の数字は開始コドンATGのAを+1としたときの塩基数を示し、右の数字は開始コドンを1としたときのアミノ酸残基数を示してある。

CT-rich sequence, CCAATbox, TATAbox 様の配列が存在しており、このモジュールが実際に担子菌内でプロモーターとして機能しているか否かは、興味を引くところである。

*Le. ras*や*priA*と同様に、 2.7kbの*priB*cDNAをプローブにしてシイタケFMC2株の菌糸塊、子実体原基、成熟子実体の 全RNAに対するノーザンブロット解析を行った。転写発現パターンを比較する場合のコントロールとして、1.2kbの*Le. ras*cDNAを同時にプローブとした。 その結果、予想通り*priB*遺伝子は子実体原基時において高程度に転写発現していることが認められた（図3-6）。 *priB*の転写発現パターンは*priA*のパターンとほぼ同じ結果となり、*priB*も子実体形成初期において何らかの働きをしていることが示唆される。ただ、*priB*の転写発現量は全般を通して*priA*のものと比べ少な目であった。

第6節　*priA*及び*priB*の推定遺伝子産物の構造特性

まず、*priA*及び*priB*の推定遺伝子産物（PRIA及びPRIB）の疎水性－親水性の度合いをKyteとDoolittleのパラメーター[83]を用いて解析した。（図3-7）PRIAはN末端部分に疎水性領域がみられた（図3-7A）。PRIBは全体的にやや親水性であり、N末端側がより親水性の度合いが強かった（図3-7B）。 次に、タンパク質のデータベースNBRFに対してPRIAやPRIBに類似するタンパク質の検索を行った。その結果、PRIAに類似するタンパク質としてKinase-related transforming タンパク質、cGMP依存性プロテインキナーゼ、チミジンキナーゼ等が候補として挙がったが、より詳細に検討したところ、それらは有意義な類似性ではなかった。さらに、PRIAのアミノ酸配列を全体的に眺めてみると19個のシステイン残基がPRIA全域に散らばっていることが解った。そこでシステイン残基を指標にしてPRIAの構造を検討したところ、PRIAの中央にZnフィンガーモチーフに似た配列が、C末端側にはZnクラスターモチーフに似た配列が見られた（図3-8）。Znフィンガーモチーフは DNA結合性タンパク質のDNA結合ドメインとして転写因子TFIIIA等で同定されていることから[84]、PRIAはDNA結合性タンパク質であるのかもしれない。 PRIBに対しては、癌遺伝子*c-fos*がコードする核局在性タンパク質(c-FOS)と低いながら相同性を示す領域が見つかった。c-FOSは、

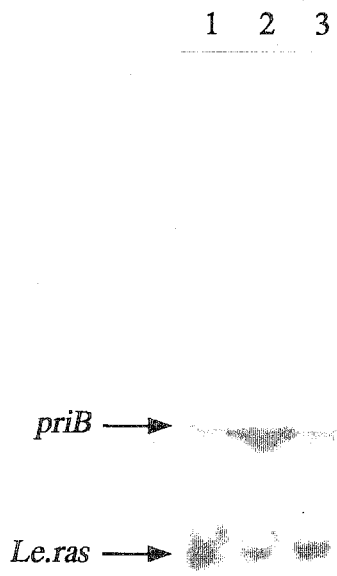
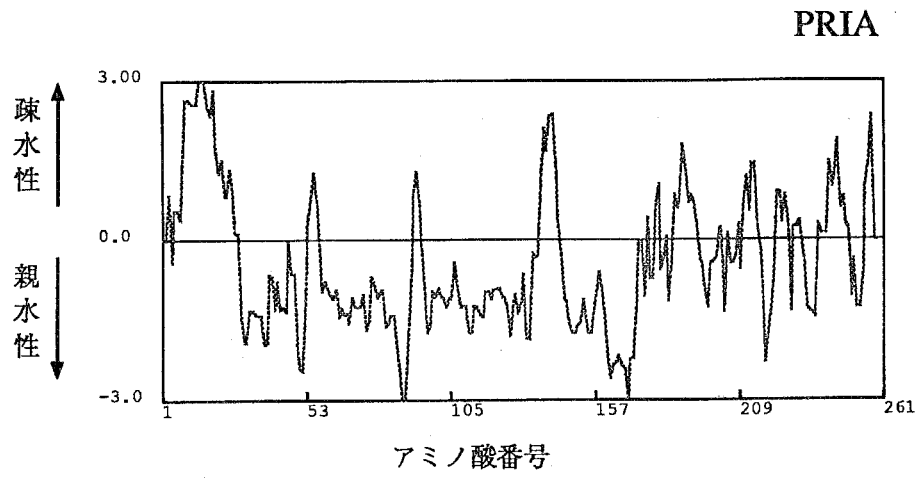


図3-6　*priB*及び*Le.ras*遺伝子の子実体形成過程における転写発現パターン

菌叢から抽出した全RNA(レーン1)、子実体原基から抽出した全RNA(レーン2)、成熟子実体から抽出した全RNA(レーン3）をそれぞれ電気泳動でサイズ毎に分け、ナイロンメンブレンフィルターに移した。そして、*PriB*cDNAと*Le.ras*cDNAを同時にプローブに用いてノーザンブロットを行った。



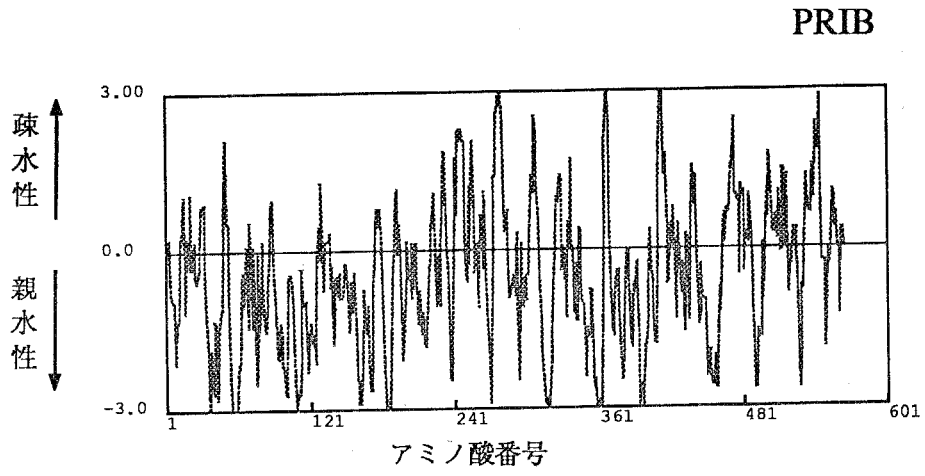
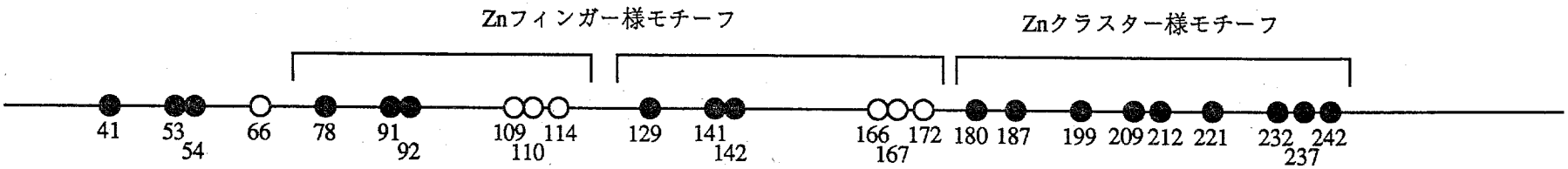
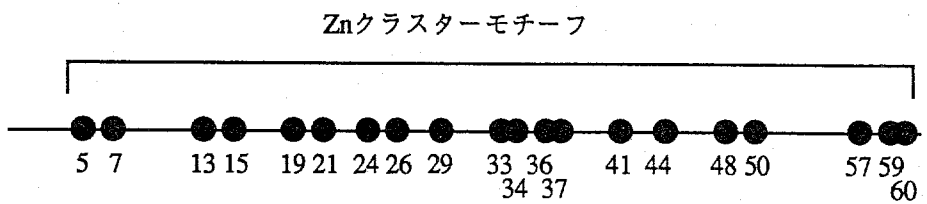


図3-7　PRIA及びPRIBタンパク質の疎水性-親水性のパターン

パターンはKyteとDoolittleのパラメーター[83]を用いて決定した。5個ずつのアミノ酸の値を平均してプロットしてある。左の数字は大きくなるほど疎水性が強くなる。



PRIAタンパク質



メタロチオネイン

図3-8　PRIAタンパク質の推定Zn結合性モチーフと
メタロチオネインのZnクラスターモチーフ

黒円はシステイン残基、白円はヒスチジン残基を示す。
下の数字はアミノ酸番号を示す。

この領域に DNA結合性モチーフの一つであるロイシンジッパー(bZIP)構造が有り[85]、PRIBにもbZIP構造と考えられる領域が認められた。c-FOSは別の癌遺伝子産物c-JUNとbZIP構造を介してヘテロ二量体を形成していることから[86),87)]、PRIBがそれ自身及び別のタンパク質と二量体を形成するのかも知れない。さらにbZIPのすぐN末端側には、真菌類の転写調節因子のDNA結合性モチーフの一つであるZnクラスターモチーフが見いだされた。 これより、PRIBはDNA結合性タンパク質である可能性が高いと考えられる。

第7節　考察

この章では、担子菌に代表される形態分化である子実体形成に関連すると示唆される遺伝子*priA*及び*priB*をクローニングし、その塩基配列と推定アミノ酸配列を決定して類推する遺伝子産物(PRIAとPRIB)の構造特性を解析した。

タンパク質のデータベースを用いての検索では、PRIAに類似するタンパク質は見つからなったが、アミノ酸配列を全体的に眺めてみると19個のシステイン残基がPRIA全域に散らばっていることが解った（図3-8）。 このシステイン残基を指標にPRIAの構造を検討したところ、2つのZnフィンガー様モチーフと1つのZnクラスター様モチーフを見つけることができた。PRIAのZnフィンガー様モチーフはシステイン2残基とヒスチジン2残基でZn^{2+}イオンを配置する転写因子TFIIIAのZnフィンガーモチーフ[88]と類似しており、PRIAはDNA結合性タンパク質であるかもしれない。またZnクラスター様モチーフは、細胞質局在性の金属結合性タンパク質で、生体内では特にZnの再分布に関与すると示唆されているメタロチオネイン型のZnクラスターモチーフ[89]（図3-7）と類似しており、上記のZnフィンガー様モチーフのことも考え合わせると、PRIAは少なくとも金属、特にZn結合性タンパク質である可能性が高い。

PRIBについては、 N末端側にZnクラスターモチーフとbZIP構造をとり得ることが示唆された。Znクラスターモチーフは、様々な真菌類の転写調節因子に保存されている。 図3-9にPRIBと各種のZnクラスターモチーフをとり得る転写調節因子との比較を示した。モチーフ内のシステイン残基は、それぞれのタンパク質で保存されているが、これらの間にあるアミノ酸残基の相同性はあまり無いようである。各種の転写調節因子の内、出芽酵母由来のGAL4においてZnクラスターモチーフの研究が盛んに行われており、X線解析[90]やNMR解析[91]によって推定される立体構造が提唱されている。提唱された立体構造をもとにPRIBの立体構造を類推すると図3-10の様になると考えられる。 また図3-9に示した転写調節因子は、 Znを配位結合してDNA結合性を獲得し、遺伝子の制御領域に結合することで遺伝子の発現調節を行っている。PRIBがbZIP構造を持つことも考慮すると、PRIBは、 ホモ二量体或いはヘテロ二量体を形成してDNAに結合する

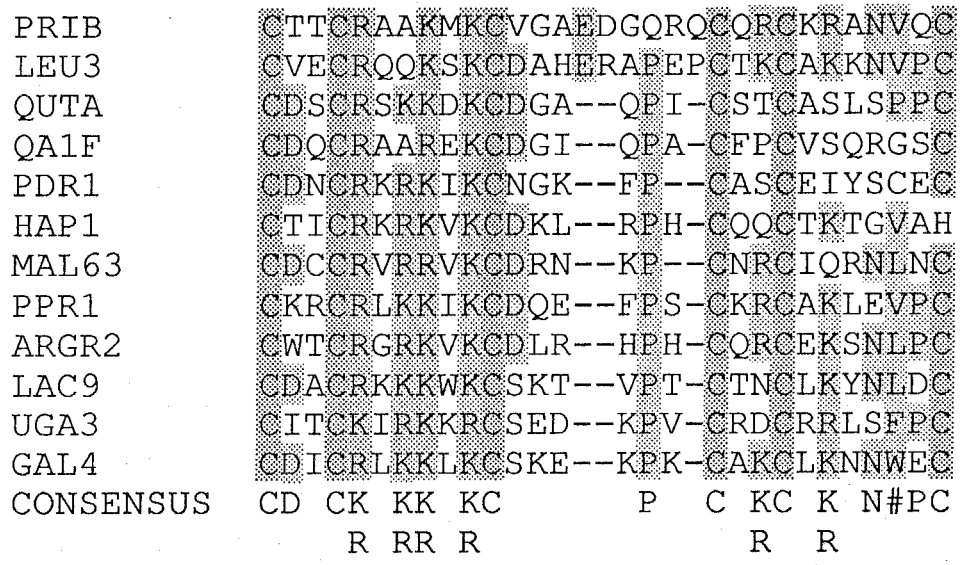


図3-9　PRIBと真菌類の各種転写因子に見られる保存されたアミノ酸配列

保存された6つのシステイン残基及び共通アミノ酸残基は網かけで示してある。#は疎水性アミノ酸残基を示す。上記の各種転写因子の参考文献を以下に示す。LEU3[92]QUTA[93]QA1F[94] PDR1[98] HAP1[96]MAL63[97]PPR1[95]ARGR2[99]LAC9[100]UGA3[101]GAL4[102]

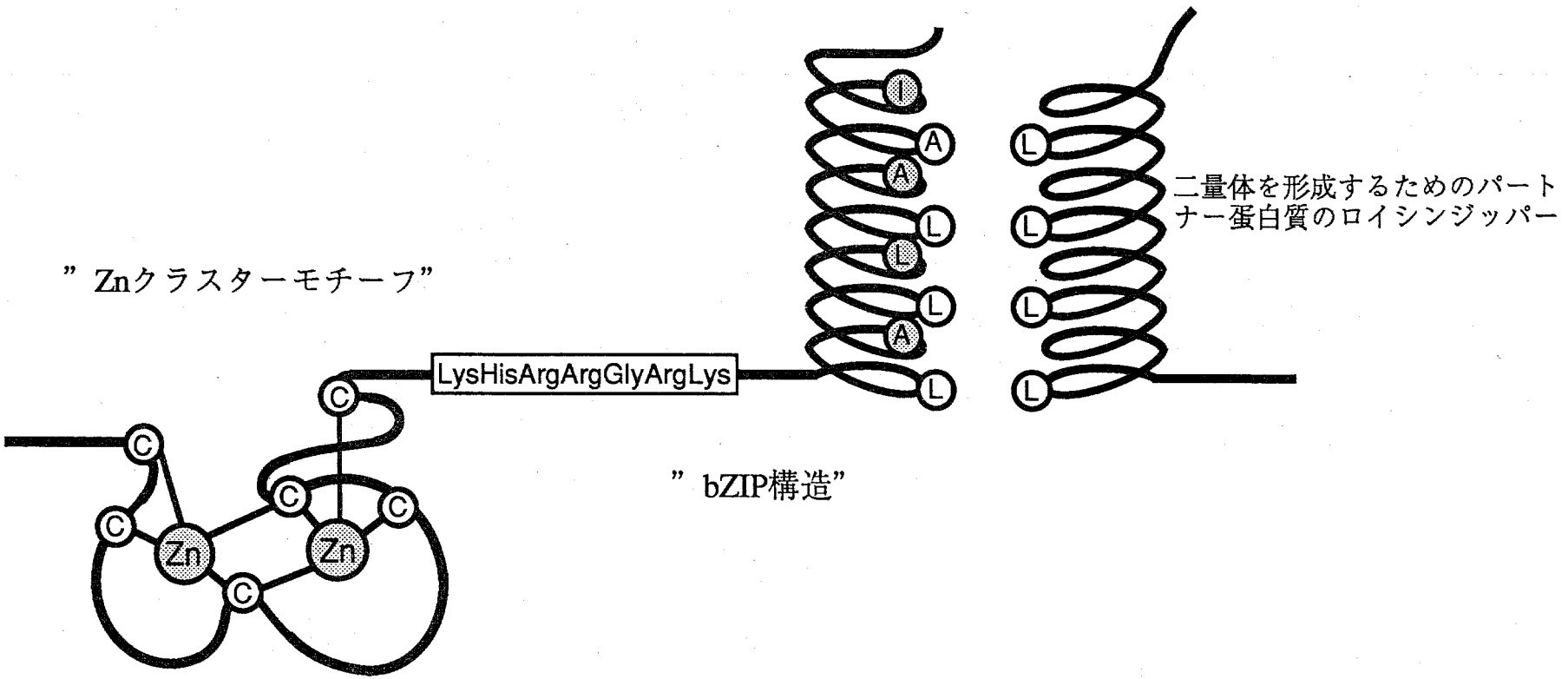


図3-10　PRIBタンパク質のN末端側に存在するDNA結合性モチーフの推定模式図

Znクラスターモチーフの模式図は文献[89]、bZIP構造の模式図は文献[85]に示されたものを用いた。

転写調節因子であると予想される。 さらに、図3-9の転写調節因子の中のGAL4[103]、QA1F[94]、QUTA[93]をコードする遺伝子は、各々それらが転写調節する遺伝子と染色体上でクラスターを形成していることから、もしPRIBが転写調節因子であり、PRIBが調節する遺伝子とクラスターを形成しているとすれば、*priB*cDNAの下流側に認められたプロモーターに類似したモジュール （図3-4）は隣接する遺伝子のプロモーターとして実際に機能しているのかもしれない。そしてプロモーター上には、PRIBの認識部位が有るかもしれない。この様な仮説は、*priB*遺伝子の周りの遺伝子をクローニングすることにより、ある程度証明できると考えられる。ちなみに次章で述べる*priB*遺伝子の上流領域に見られる QA1F認識部位[94]が、*priB*cDNAの下流側に認められたプロモーター様モジュール内にも認められた（図4-15）。

ここまでに述べてきた事は、*priA*及び*priB*遺伝子の一次構造から推測される結果であるので、実際にPRIAとPRIBの機能を証明するには遺伝子産物レベルでの解析が必要である。そのためには、シイタケよりPRIAやPRIBを精製してくるかもしくは*priA*及び*priB*遺伝子を用い大腸菌や出芽酵母内で大量生産させて精製する事が考えられる。現在当研究室では更に研究が進められ、*priA*については菅野が融合タンパク質として大腸菌での生産に成功していて、更なる解析を行っている。

第４章　*Le.ras*、*priA*及び*priB*遺伝子の制御領域の解析と担子菌の遺伝子発現ベクターへの活用

第1節　序論

遺伝子を発現させるためには、2つのDNA要素すなわち、遺伝子の転写開始に特異的に関与する DNA上のシグナル領域であるプロモーターと遺伝子の転写終結とそれに続く3'プロセシングやpoly(A)付加に関与するDNA上のシグナル領域であるターミネーターとが必要である。

真核生物においては、プロモーターの基本構造としてTATAbox,CAATbox,GCboxが上げられるが、全てのプロモーターに存在するわけではなく、また基本構造だけでは弱い転写発現しか得られない。通常各々のプロモーターは、基本構造或いはその一部に加えて独自の塩基配列部位があり、この塩基配列部位をトランスに働く転写調節因子が認識することによって転写発現を強化している。転写調節因子やそれらが認識する塩基配列部位は生物種間で異なっていることがあり、そのような場合他種生物のプロモーターは正常に機能しないこともある。またターミネーター領域については、哺乳類や出芽酵母で共通配列が提唱されているが、動物細胞のものと出芽酵母のものとでは全く異なっている[104]。

ここまでの事を考慮すると、担子菌内で遺伝子を発現させるには担子菌由来のプロモーターやターミネーターが最適あるが、最近まで担子菌遺伝子の制御領域については、Skrzyniaらがヒトヨタケのトリプトファン合成酵素(*TRP1*)遺伝子上流域が*TRP1*遺伝子の発現に関わっていることを報告しているだけであった[3]。

この章では、前々章、前章で単離した *Le.ras*、*priA*及び*priB*遺伝子の制御領域を分離し、その一次構造を決定した。そして転写開始点を解析しプロモーター領域を特定した。次に*Le.ras*のプロモーターと*priA*のターミネーターを使って担子菌用遺伝子発現カセットプラスミドpLC1を作成し、真核生物に有効な抗生物質G418を不活性化させる遺伝子*APHI*をpLC1に組み込み遺伝子発現ベクターpLC1-genを作成した。最後にpLC1-gen等を用いて担子菌ヒトヨタケ、ヒラタケ、

シイタケへの形質転換を試みた。また、前章で見つけた*priB*cDNAの下流側にあるプロモーター様のモジュールが実際プロモーターとして機能するか否かを確かめるため、上述した*APHI*の上流にこのモジュールを組み入れたプラスミドを作成し、出芽酵母及びヒラタケへの形質転換を行った。

他方、別種の実験であるが、当研究室で分離した出芽酵母で ARS能を持つ、シイタケの線状プラスミドpLLE1由来の断片[15]及びヒラタケの線状プラスミドpLPO3由来の断片[42]を、 ヒトヨタケのTRP1遺伝子を含んだプラスミドpCc1001[24]に組み込み、ヒトヨタケtrp1⁻株への形質転換を試みた。

第2節　材料と方法

4-2-1　菌株

この章での実験に使用したシイタケ(*L. edodes*)、ヒラタケ(*P. ostreatus*)、ヒトヨタケ(*C. cinereus*)、出芽酵母(*S. cerevisiae*)、大腸菌(*E. coli*)の菌株、遺伝子型は表4-1に示した。

表2-1　使用菌株

Strain	Genotype	Source & Reference
L. edodes		
FMC2	Wild Type	48)
P. ostreatus		
p-11	Wild Type	H. Ishihara
C. cinereus		
LT2-44	*trp1*	S. O. Yamagi
S. cerevisiae		
D13-1A	a *trp1 his3-532 gal2 e*$^{+}$	N. Gunge
E. coli		
JM109	F' *traD36 proA*$^{+}$ *proB*$^{+}$ *lacI*^{q} *lacZ*Δ*M15/recA1 endA1 gyrA96* (Nal^{r}) *thi hsdR17 supE44 relA1* Δ*(lac-proAB) mcrA*	49)
DH1	*recA1 endA1 thi-1 hsdR17 supE44 gyrA96* (Nal^{r}) *relA1*	105)
Q358	*hsdR*$^{-}$ *hsdM*$^{+}$ *supE tonA* (ϕ80^{r})	106)

4-2-2　プラスミド及びファージDNA

この章での実験に使用した大腸菌プラスミド及びファージDNAは表4-2に示した。

表4-2　プラスミド及びファージDNA

Vector	Size(kb)	Genetic Marker	Source or Reference
Plasmid			
Charomid9-36	36.0	Amp^r	ニッポンジーンより購入
pUC18	2.7	Amp^r lacZ	49)
pUC19	2.7	Amp^r lacZ	49)
pTRP56	6.2	TRP1 Amp^r Tet^r	107)
pLC1	6.5	Amp^r	this work
pLC1-gen	7.7	Amp^r Neo^r	this work
pAJ50	15.4	Amp^r Neo^r	H.Takahashi
pAPHI	5.9	Amp^r Neo^r	this work
p3'-APHI	6.4	Amp^r Neo^r	this work
pSKP11	8.1	LEU2 Amp^r	15)
pSKP21	7.7	LEU2 Amp^r	42)
pCc1001	9.2	TRP1 Amp^r	24)
Bacteriophage			
λENBL4	41.9	Spi	108)
M13mp18	7.3	lacZ	49)
M13mp19	7.3	lacZ	49)

4-2-3　プライマー

この章で使用したプライマーは表4-3に示した。

表4-3　プライマー

Primer	Sequence
1	5'-CGGGAGGAGGAGGCGTTGATGTACA-3'
2	5'-CAAGCACGGACAATGCAACGACGCGTTTAAAGACAGTCAT-3'
3	5'-ATAATGGACAAGCTGATGATCCAACCTCGG-3'
4	5'-TCTAGATAGGAAAAGTATGTTGTTTATGAT-3'

4-2-4　培地

この章での実験に使用した培地の組成及びその作製方法を以下に示した。

1)YPD培地

1%　Bacto-yeast extract(DIFCO)

2%　Bacto peptone(DIFCO)

2%　glucose

寒天培地には、2.0%(w/v)の寒天を加えた。

Geneticin(G418)(Sigma)は、400μg/mlの濃度で使用した。

2)SD-HIS培地

0.67%　Yeast nitrogen base w/o amino acids

2%　glucose

50mg/l L-Histidine

寒天培地には、2.0%(w/v)の寒天を加えた。

3)MYG培地

0.4% glucose

1% 麦芽エキス（極東）

0.4% 酵母エキス（極東） , pH 5.6

寒天培地には、1.6%(w/v)の寒天を加えた。

4)MYGS再生培地

0.4% glucose

0.5M saccharose

1% 麦芽エキス（極東）

0.4% 酵母エキス（極東） , pH 5.6

寒天培地は、ヒラタケ用1.0%(w/v),ヒトヨタケ用1.4%(w/v)の寒天を加えた。

Geneticin(G418)(Sigma)は、200μg/mlの濃度で使用した。

5)MM再生培地

5g glucose

2g L-アスパラギン

1.5g NH_4Cl

1g KH_2PO_4

0.3g Na_2SO_4

2.25g Na_2HPO_4

0.25g $MgSO_4$

5g potato stach(Sigma)

0.04mg thiamine ／1,000ml

$MgSO_4$とthiamineはオートクレーブ滅菌後、各々加えた。

寒天培地には、1.6%(w/v),トップアガーには、0.7%(w/v)の寒天を加えた。

4-2-5　酵素と反応

制限酵素は宝酒造、東洋紡、ニッポンジーンより購入した。Bacterial alkaline phosphatase,T4 polynucleotide kinase,T4 DNA ligase,Klenow enzyme,は宝酒造及びニッポンジーンより購入し、これらの酵素を使用する際には使用説明書に従った。SuperScript™ RNaseH⁻ reverse transcriptaseはGIBCO BRLより購入した。*Pfu* DNA polymeraseはSTRATAGENEより購入した。DNaseIとRNaseAは、Sigmaより購入し、 RNaseAは10mM Tris-HCl(pH 7.5)に10mg/mlになるように溶解し、20分間煮沸してDNaseを失活させた後使用した。 Proteinase Kは和光純薬より購入した。塩基配列を決定するためのデレーションプラスミド作製用には、Kilo-Sequence用Deletion Kit（宝酒造）を用いた。 S1nucleaseは三共製薬（株）より分与を受け、さらに精製されたものを用いた。反応は、45 mM 酢酸ナトリウム/1.5mM $MnCl_2$/1.5mM $ZnSO_4$/150mM NaCl(pH 5.0)の系で37℃、1時間行った。細胞壁分解酵素は、 Cellurase Onozuka R-10がヤクルト製薬、Novozyme 234がNovo、ChitinaseがSigmaより購入した。

4-2-6　Poly(A)⁺RNAの精製

poly(A)⁺RNAはOligotex™-dT30を用いて精製した。精製方法は使用説明書に従った。

4-2-7　プライマー伸長法[109)]

Oligotex™-dT30を用いて精製したmRNA(2μg)に50pmolのプライマーを加えて計10μlとし、4μlの5×reaction buffer[0.25M Tris-HCl,0.375M KCl,15mM $MgCl_2$;pH 8.3]、2μlの0.1M dithiothreitol(DTT)、1μlのdNTPsol.[10mM dATP,dGTP,dTTP,0.5mM dCTP]、1μlの[α-32P]dCTP(10mCi/ml)を加え37℃で15分間保温する。1μlのSuperScript™ RNaseH⁻ reverse transcriptaseを加え、さらに37℃で45分間保温する。エタノール沈澱を行い、塩基配列決定用の4M尿素-8%ポ

リアクリルアミドゲルで電気泳動してオートラジオグラフィーを行った。

4-2-8　PCR(Polymerase Chain Reaction)

Pfu DNA polymeraseを用いて20mM Tris-HCl/10mM KCl/6mM (NH4)2SO4/2mM MgCl2/1% Triton X-100/1mg/ml BSA/10mM dNTP(pH 8.8)の系で行った。反応サイクルは94℃,30秒間→90秒間→45℃,1秒間→1秒間→75℃,6.5分間で30回行った。

4-2-9　出芽酵母の形質転換法

出芽酵母の形質転換は、Itoらの酢酸リチウム法[110]を一部改良して行った。一晩YPD培地で培養した出芽酵母培養液2mlを100mlのYPD培地に植菌し、30℃で4時間振とう培養した。4時間後、3,000rpm,室温で10分間遠心して沈澱させ、20mlの滅菌したTE bufferを加え懸濁した。更に3,000rpm,室温で10分間遠心して沈澱させ、1mlの0.1M 酢酸リチウム/10mM Tris-HCl/1mM EDTA(pH 7.5)を加えて懸濁し、懸濁液を30℃で1～24時間保温した。100μlの懸濁液に対し計10μl以上の40μg Carrier DNA,0.1～2μg ﾌﾟﾗｽﾐﾄﾞDNAを加え混合し、30℃で30分間保温した。次に0.7mlのLi-PEG[40% PEG-4,000,0.1M 酢酸ﾘﾁｳﾑ,10mM Tris-HCl,1mM EDTA;pH 7.5]を加え混合した後、30℃で30分間保温した。42℃で5分間温め、15,000rpm,室温で2秒間遠心し上清を捨てた。更に1mlのTE bufferを加え懸濁し、15,000rpm,室温で2秒間遠心し上清を捨てた。沈澱を0.2mlのTE bufferに懸濁して10mlのYPD培地に加えた。30℃で4時間振とう培養した後、3,000rpm,室温で10分間遠心して沈澱させて0.1mlのTE bufferに懸濁した。この懸濁液を選択用寒天培地に蒔き、30℃で2～3日間培養した。

4-2-10　シイタケのプロトプラスト調製法

PSA寒天培地上に一面に生えたシイタケの菌糸を寒天ごと 500mlのSMY培地に植菌して2週間静置培養した。増殖した菌糸を吸引ろ過で集菌し、湿重量を測

定した。湿重量150mg当たり1mlの反応溶液[1% Cellurase Onozuka R-10, 0.1% Chitinase, 0.5M Mannitol, 0.05M Maleric acid;pH 4.6]を加え混合し、28℃で3～4時間保温した。反応後、60μmのナイロンメッシュでろ過した。 さらに、洗浄溶液[0.5M Mannitol, 0.05M Maleric acid;pH 4.6]で数回洗浄し 顕微鏡でプロトプラストの数を数えた。

4-2-11　ヒラタケの形質転換法

ヒラタケの形質転換は、Pengらの方法[28]をもとに行った。PSA寒天培地上に一面に生えたヒラタケの菌糸を寒天ごとワーリングブレンダーのカップに入れ、適量のSMY培地を加えて3,000rpm以上で60秒間ブレンドした。この破砕液を500mlのSMY培地に植菌して3日間静置培養した。増殖した菌糸を吸引ろ過で集菌し、湿重量を測定した。湿重量150mg当たり1mlの反応溶液[1% Novozyme 234, 0.5M Mannitol, 0.05M Maleric acid;pH 5.5]を加え混合し、32℃で2時間保温した。反応後、60μmのナイロンメッシュでろ過して4,000rpm, 室温で10分間遠心した。さらに、10mlのMM緩衝液[0.5M Mannitol, 0.05M Maleric acid;pH 5.5]で2回洗浄（4,000rpm, 室温で10分間）した後、10mlのMMC緩衝液[0.5M Mannitol, 0.05M Maleric acid;pH 5.5]を加えて穏やかに懸濁し、 顕微鏡でプロトプラストの数を数えた。続いて、4,000rpm, 室温で10分間遠心して、プロトプラストが1ml当たり5×10^8個になるようにMMC緩衝液を加え穏やかに攪拌した。 200μlのプロトプラスト液に対して、計30μlの20μg ﾌﾟﾗｽﾐﾄﾞDNA, 0.3mg Haparinと40μlのp.PEG緩衝液[60% PEG-4,000, 10mM $CaCl_2$, 10mM Tris-HCl;pH 7.4]を加え混合し、氷上で45分間保冷した。保冷後、1mlのp.PEG緩衝液を加え攪拌し、室温で15分間放置した。 10mlのMYGS再生培地を加え混合後、4,000rpm, 室温で10分間遠心して上清を捨てた。沈澱に1mlのMYGS再生培地を加えて混合し、10mlのMYGS再生培地に加え、25℃で5日間静置培養した。最後に45℃に保温した20mlのMYGS選択用寒天培地(1% Agar)と混合して、シャーレ上に広げ固化させた。 このシャーレを28℃で2週間培養した。

4-2-12　ヒトヨタケの形質転換法

ヒトヨタケの形質転換は、Binningerらの方法[26]をもとに行った。スラント上に一面に生えたヒトヨタケの分生子(oidia)にMYG培地(0.1mg/mlのL-ﾄﾘﾌﾟﾄﾌｧﾝを含む)を加えて分生子を掻き取り、130μmのナイロンメッシュを通して200mlの三角フラスコに移し30℃で48～60時間静置培養した。増殖した菌糸を5,000rpm,室温で10分間遠心して、 10mlのMM緩衝液で1回洗浄(5,000rpm,室温で10分間)した。洗浄した菌糸を1mlの反応溶液[1% Novozyme 234,0.1% Chitinase,0.5M Mannitol,0.05M Maleric acid;pH 5.5]を加え混合し、 30℃で2時間保温した。反応後、60μmのナイロンメッシュでろ過して3,000rpm,室温で10分間遠心した。さらに、 10mlのMM緩衝液[0.5M Mannitol,0.05M Maleric acid;pH 5.5]で2回洗浄（3,000rpm,室温で10分間）した後、10mlのMMC緩衝液[0.5M Mannitol,0.05M Maleric acid;pH 5.5]を加えて穏やかに懸濁し、 顕微鏡でプロトプラストの数を数えた。 続いて、3,000rpm,室温で10分間遠心して、プロトプラストが1ml当たり5×10^7個になるようにMMC緩衝液を加え穏やかに攪拌した。200μlのプロトプラスト液に対して、20μlの20μg ﾌﾟﾗｽﾐﾄﾞDNAと 50μlのc.PEG緩衝液[25% PEG-4,000,50mM $CaCl_2$,10mM Tris-HCl;pH 7.5]を加え混合し、 氷上で20分間保冷した。 保冷後、2mlのc.PEG緩衝液を加え攪拌し、室温で5分間放置した。 薬剤選択の場合、15mlのMYGS再生培地を加え混合して、30℃で2日間静置培養した。 最後に45℃に保温した15mlのMYGS選択用寒天培地(1.4% Agar)と混合して、シャーレ上に広げ固化させた。このシャーレを30℃で 2週間培養した。トリプトファン要求性の場合、5分間放置後、その内の1mlを50℃に保温した10mlのMM再生培地のトップアガーに加え混合し、MM再生培地上に蒔いて固化させ、30℃で2週間培養した。

4-2-13　その他

上記以外の材料と方法は、 前々章及び前章の第2節に示したものに従って行った。

第3節　*Le.ras*、*priA*及び*priB*遺伝子の制御領域の分離

まず*Le.ras*遺伝子の上流域として、*Le.ras*の1.2kb*Hin*dIII-*Xba*I断片の*Hin*dIII部位の上流約2.7Kbと 1.2kb*Hin*dIII-*Xba*I断片に相当する配列とを含む約4Kbの*Xba*IDNA断片を、 新たに作製したシイタケのCharomid9-36-染色体DNAライブラリーからコロニーハイブリダイゼーションによって分離し、その制限酵素切断点地図を作成した（図4-1）。*Le.ras*遺伝子の下流域としては、5.6kb*Hin*dIII断片から250bp*Xba*I断片及び4.3kb*Xba*I-*Hin*dIII断片をサブクローニングした。（図4-1）

次に、*priA*遺伝子の上流域を分離した。新たに作製したシイタケのλEMBL4-染色体DNAライブラリーから、 *priA*の2.6kb*Eco*RI断片をプローブにしたプラークハイブリダイゼーションによって、2.6kb*Eco*RI断片とハイブリダイズするDNAクローンを得た。さらにサブクローニングよって、2.6kb*Eco*RI断片の*Eco*RI部位の上流約1.2kbと180bp*Eco*RI-*Pst*I断片に相当する配列とを含む約1.4kbの*Sac*I-*Pst*I断片を分離し、 その制限酵素切断点地図を作成した（図4-2）。*priA*遺伝子の下流域としては、 2.6kb*Eco*RI断片から1.3kb*Xba*I-*Eco*RI断片をサブクローニングした（図4-2）。

続いて、*priB*遺伝子の上流域については、新たに作製したシイタケのCharomid9-36-染色体DNAライブラリーより、*priB*cDNAの上流約2.4kbと500bpの構造遺伝子に相当する配列とを含む約2.9kbの*Hin*dIII断片を分離し、その制限酵素切断点地図を作成した。（図4-3） なお、ターミネーターは動物細胞等の例からも解るように同類間で共通している事を考え、*priB*遺伝子の下流域の分離は今回行わなかった。

第4節　*Le.ras*、*priA*及び*priB*遺伝子の制御領域の構造特性

4-4-1　*Le.ras*遺伝子のプロモーターとターミネーター領域の塩基配列の決定

*Le.ras*遺伝子の上流約2.7kbの全塩基配列を決定した（図4-4）。それによる

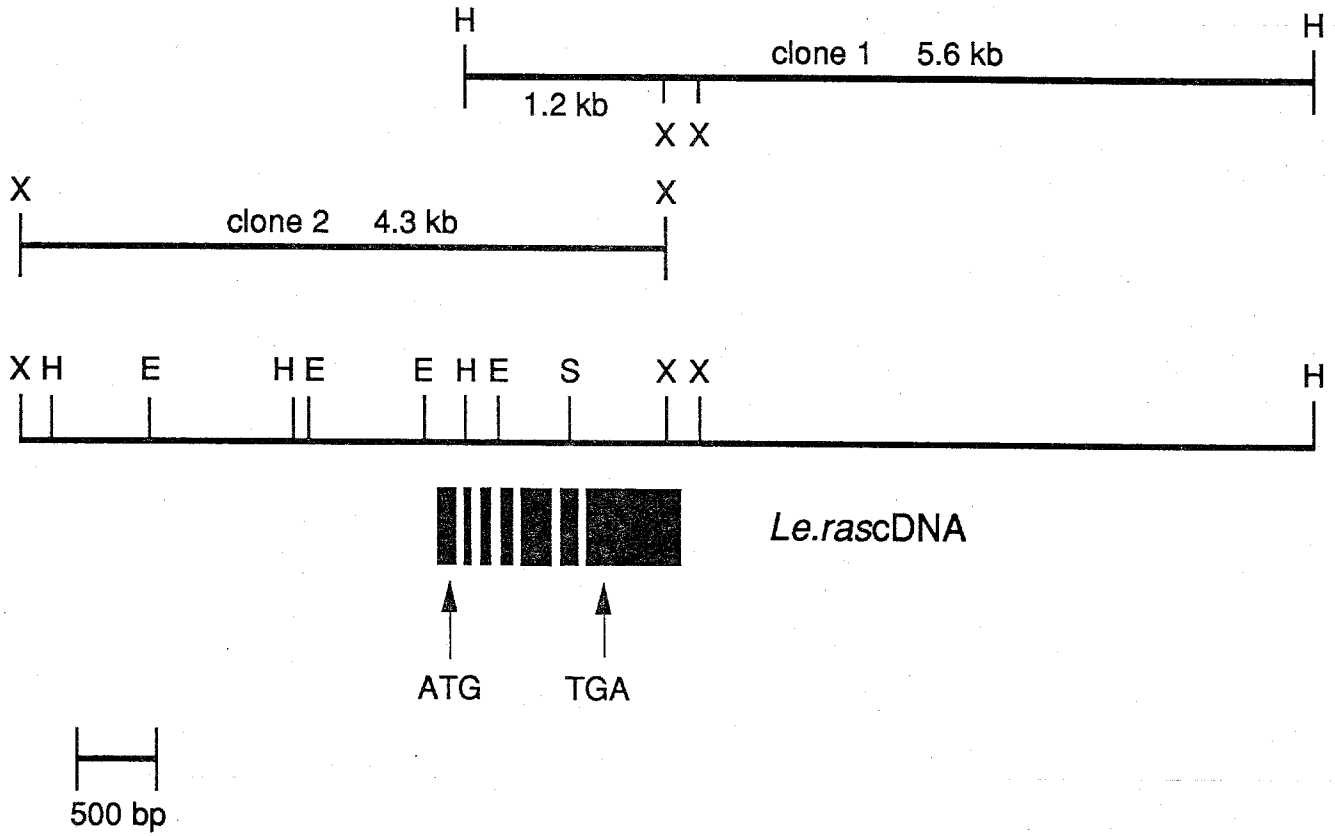


図4-1　*Le.ras*遺伝子とその上流域の制限酵素切断点地図

ATG及びTAGはそれぞれ開始コドンと終止コドンを示す。黒四角はエキソンを示す。制限酵素認識部位は以下の文字で示してある。
E: *Eco*RI,H: *Hin*dIII,S: *Sal*I,X: *Xba*I

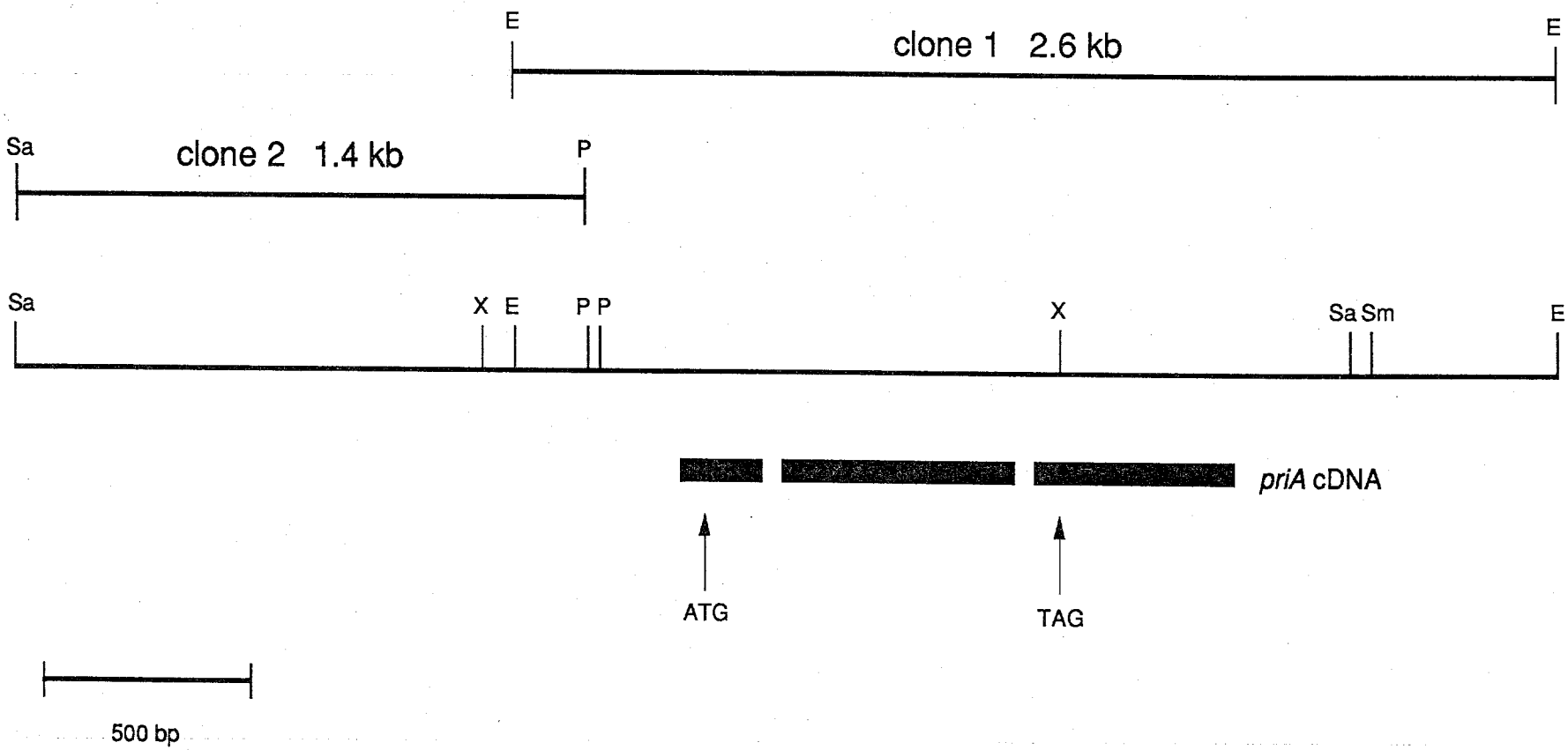


図4-2 *priA*遺伝子とその上流域の制限酵素切断点地図

ATG及びTAGはそれぞれ開始コドンと終止コドンを、黒四角はエキソンを示す。制限酵素認識部位は以下の文字で示してある。
E: *Eco*RI,P: *Pst*I,Sa: *Sac*I,Sm: *Sma*I,X: *Xba*I

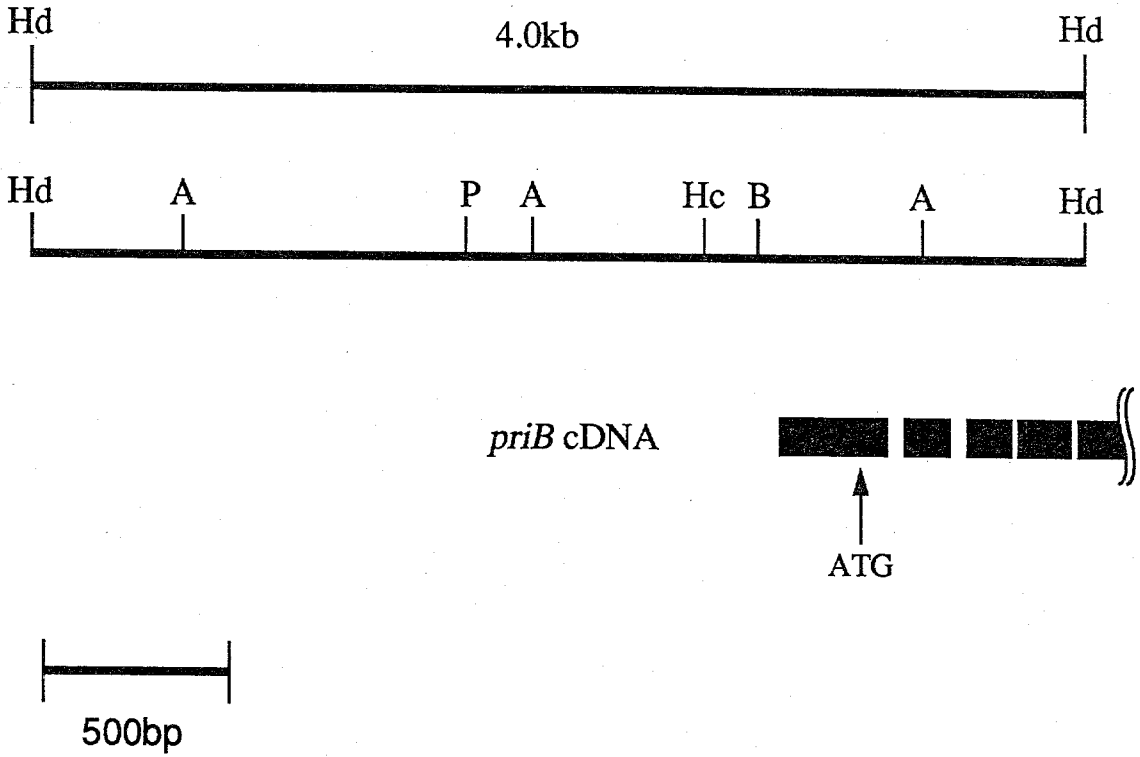


図4-3　*priB*遺伝子の上流域の制限酵素切断点地図

ATGは翻訳開始コドンを示す。制限酵素認識部位は以下の文字で示してある。
A: *Ava*I,B: *BamH*I,Hc: *Hinc*II,Hd: *Hind*III,P: *Pst*I

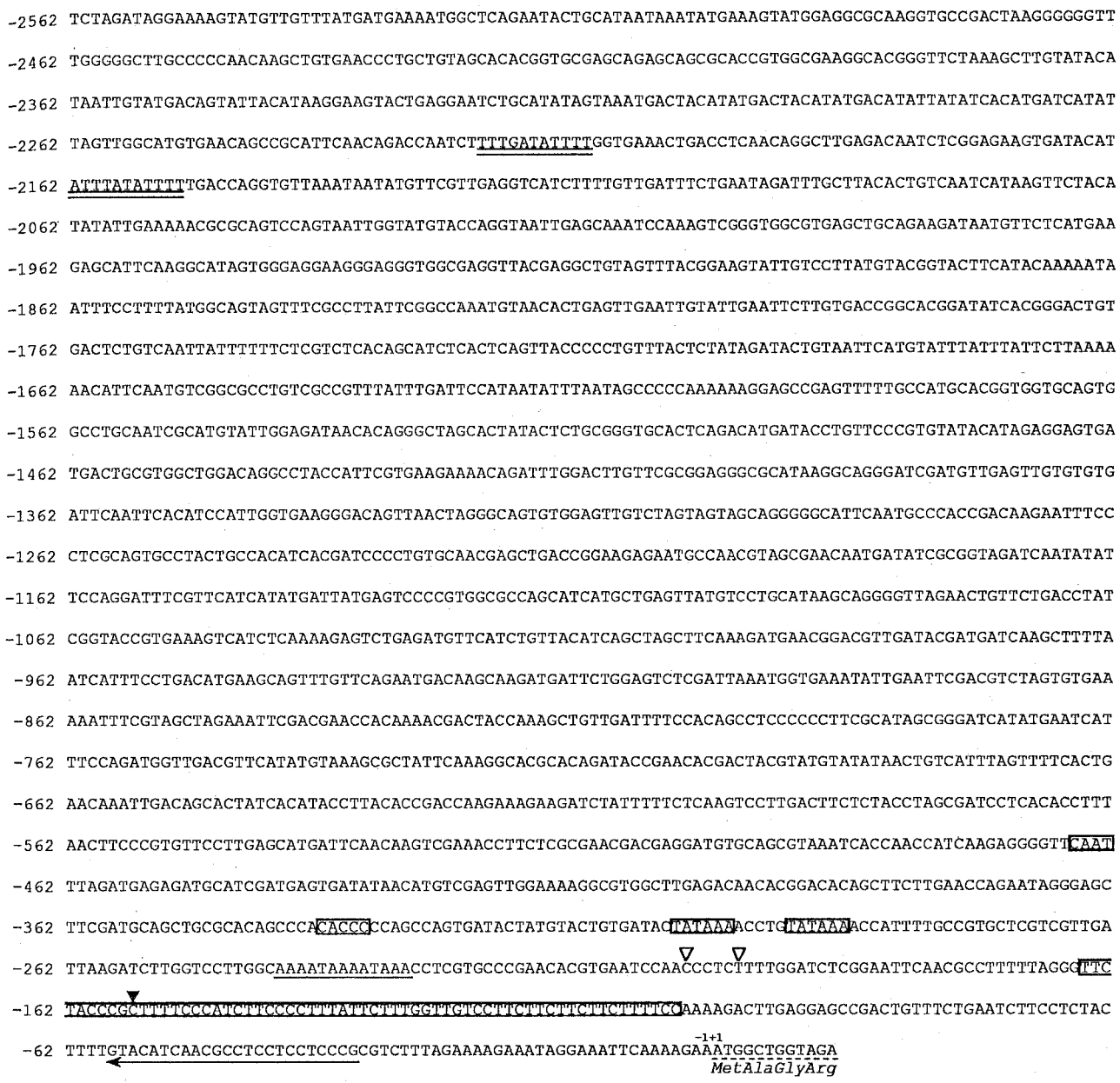


図4-4　*Le.ras*遺伝子の上流域(2,562bp)の塩基配列

CAATbox,CACCCbox,TATAAAbox,CT-rich sequenceは四角で囲って示してある。ARS共通配列及びARS共通様配列は二重下線で、AT-rich sequenceは下線で示してある。転写開始点(tsp)については、major tspとalternative tspをそれぞれ黒三角と白三角で示し、tspの解析に用いたプライマー1は横矢印で示してある。*Le.ras*のエキソン1は破線で示してある。左の数字は翻訳開始コドンからの塩基対数を示す。破線の下は対応するアミノ酸を示してある。

と、翻訳開始コドンの上流466塩基までの間にCAATbox,CACCCboxが一つずつとTATAAAboxが連続して二つ、CT-rich sequenceが一つ存在していた。さらにTATA box様のAT-rich sequenceがTATAAAboxとCT-rich sequenceの間に認められた。CT-rich sequenceは、多数の糸状菌遺伝子の上流域でも見つかっている配列であるが、中でも*Le.ras*のCT-rich sequenceは62塩基中55塩基がピリミジンである長い配列であった。 また、ヒトやマウスなどの*ras*遺伝子のプロモーターに複数見られる転写調節因子Sp1の認識部位であるGCboxは、*Le.ras*のプロモーターには上流2.7kbまでに一つも見いだされなかった。 一方、プロモーターとは直接関係ないが、*Le.ras*の翻訳開始コドンの上流2,280塩基付近に出芽酵母のARS共通配列が認められ、その60塩基上流にはARS共通配列と1塩基違いの配列が認められた。

*Le.ras*遺伝子の下流域は、1.2kb*Hin*dIII-*Xba*I断片の*Xba*I部位の下流670bpの塩基配列を決定した（図4-5）。 *Le.ras*の終止コドンから下流514～565塩基に亘って哺乳類で見つかっているpoly(A)シグナルの共通配列AATAAA---$(GT)_n$[111]に類似の配列が、 587～650塩基に亘って出芽酵母で見つかっている転写終結・poly(A)シグナルの共通配列TAG---TAGT(TATGT)---TTT[112]様の配列が見い出された。 単離した*Le.ras*cDNAにはpoly(A)尾部が含まれていなかったので明確なことは言えないが、解析した下流域は*Le.ras*遺伝子のターミネーター領域と考えられる。

4-4-2 *priA*遺伝子のプロモーターとターミネーター領域の塩基配列の決定

*priA*遺伝子の上流域約1.4kb*Sac*I-*Pst*I断片の塩基配列を決定し、同時に*Pst*I部位側の下流から翻訳開始コドンまでの塩基配列(約300bp)も決定した（図4-6）。その結果、翻訳開始コドンの上流308塩基までの間にGCbox,CAATbox,TATAAAbox,CT-rich sequenceが各々一つずつ存在していた。さらに上流523～514塩基の間に、植物の集光性クロロフィルa/b結合蛋白質の遺伝子(*cab*)[113]やカルコン合成酵素の遺伝子(*chs*)[114]等のプロモーターにあるGbox($^{A}/_{G}{}^{G}/_{C}$ACGTGGC)様の配列が認められた[115]。Gboxは、光による遺伝子発現誘導に関与するシスエレメントとして同定された塩基配列であり、光の他に植物ホルモンによって誘導さ

```
259 TCTAGAATCTTACACGCACACACACCACACTTCCGTTACACCACTCGCAACAGCTGTTTC

319 ACGTTCGTCTTTTCCAACACTCCAGAATGTACATATATCAATGCGGAAATTTGAATGGAA

                    *
379 ATTCACTGATCAACTCGGTCTTTGCATGCTATGAGGATTGGAGTACCGTTCTACCTAACG

439 TATACACATCTGGTTTGATGTGGCAGACTTCCTTACGAGGTGGATAACGGTCGATAAGGT

499 CGTTGTCAAATCTAGAATAATTCATGCAAGATGATTGTGTACAGTCATTCCTAGGCCATT

559 TGTGTACATCTAATATCCTTTATGTAAGTAGACAGTGGCCGGAATCCGCTCTCTGAAGTG

629 CCCGTGAAACCCTTTGTAGTGGACGAAATTTTATCAGAGGAAAATTTAGCTCCATTACTC

689 ACGAAAACGGGGACGGCGGCCCTCATGATAATCATGCAATATCTAAGTCTTGGCGAACCT

749 AGCGGTGCTTGCTTCAAGCGAGTAATACATACTAAAAGTTGAGTGAGCAGTCGCGAATTA

809 AGTATATTCGTCGTTTCGCGGTGAGGAAATTGACAGTGCAGCGAAAATATTACTAACAAG

869 TGCAATTTAGACCGGATCAGAAATATTTAATATTCCAGCTCTTCTGTTCTTCCAAATACC

919 TAGTCCGGTC
```

図4-5　*Le.ras*遺伝子の下流域(670bp)の塩基配列

哺乳類のpoly(A)シグナルの共通配列様配列は下線で示してある。出芽酵母の転写終結・poly(A)シグナルの共通配列様配列は四角で囲んで示してある。アスタリスクは単離した*Le.ras*cDNAの末端の位置を示す。左の数字は終止コドンからの塩基対数を示す。

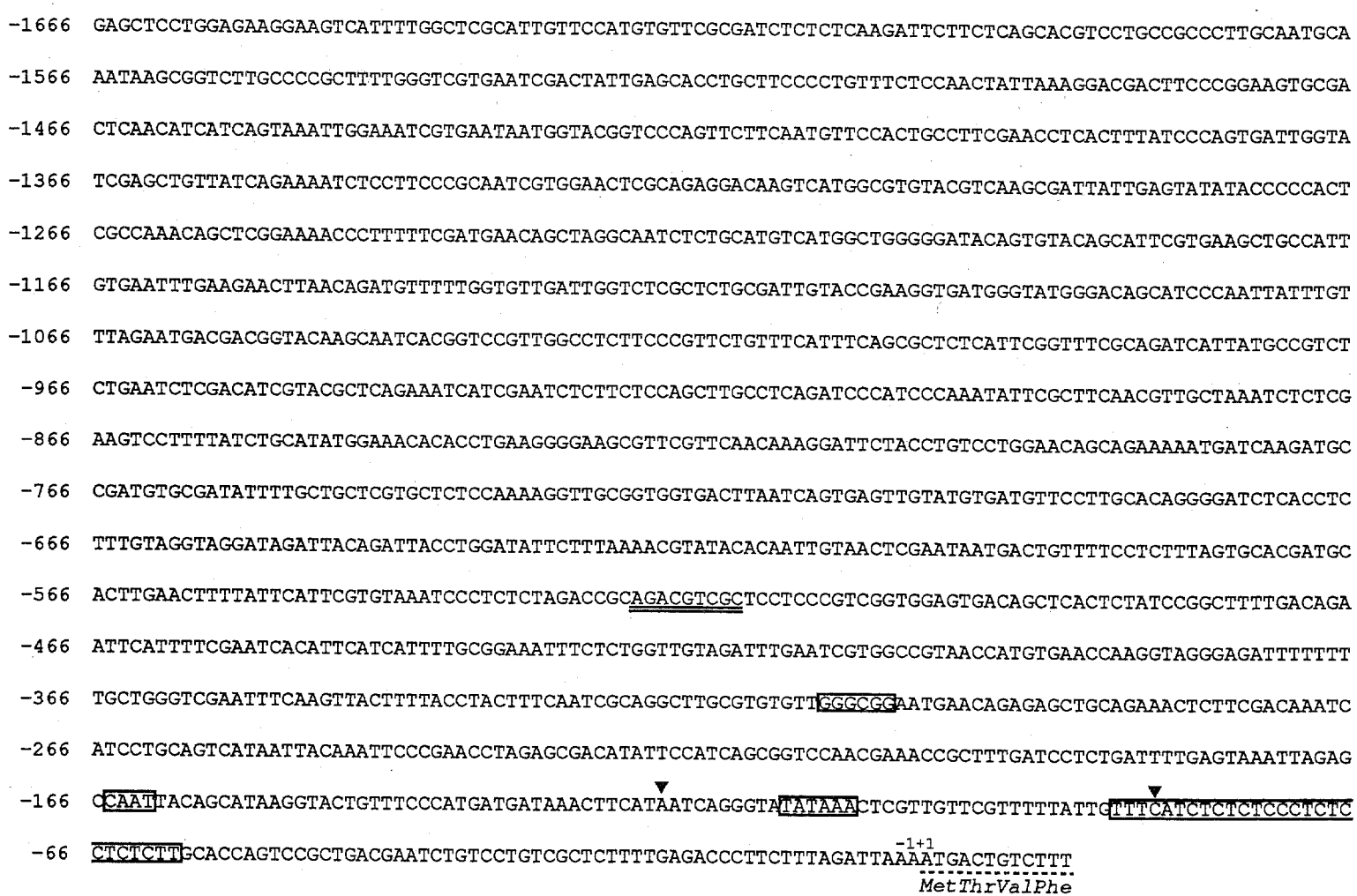


図4-6　*priA*遺伝子の上流域(1,666bp)の塩基配列

CAATbox,GCbox,TATAAAbox,CT-rich sequenceは四角で囲って示してある。Gboxは二重下線で、転写開始点(tsp)は三角で示してある。tspの解析に用いたプライマー2は+30～+1までの塩基配列に相補的な5'-CAAGCACGGACAATGCAACGACGCGTTTTAAAGACAGTCAT-3'である。*priA*のエキソン1の一部は破線で示してあり、破線の下は対応するアミノ酸を示してある。左の数字は翻訳開始コドンからの塩基対数を示してある。

れる遺伝子のプロモーターでも見つけられている[116]。Gboxが*priA*遺伝子のプロモーターに存在することから考えると、*priA*遺伝子は光或いはホルモン様シグナルによって誘導されているのかもしれない。

*priA*遺伝子の下流域1.3kb*Xba*I-*Eco*RI断片の全塩基配列を決定した。図4-7にその一部を示した。*priA*cDNAのpoly(A)付加の位置を考慮してpoly(A)シグナルを検索したところ、終止コドンの下流384～412塩基の間に出芽酵母の転写終結・poly(A)シグナルの共通配列TAG---TAGT(TATGT)---TTT[112]様の配列が見つかった。

4-4-3 *priB*遺伝子のプロモーターの塩基配列の決定

*priB*遺伝子の上流域2.4kbの塩基配列を決定した。図4-8には、翻訳開始コドンから約1.4kb上流までを示した。図より解るように、2つのCAATboxが連続して並んでいてその下流に短いCT-rich sequenceが存在していた。また、CAATboxとCT-rich sequenceの間にAT-rich sequenceとpriA遺伝子のプロモーターにも見られたGbox相同配列があり、かなり上流の-761～-794塩基と-1179～-1327塩基の間に各々2つずつアカパンカビ(*Neurospora crassa*)の転写調節因子QA1F結合部位[94]様配列が見られた。

4-4-4 CT-rich sequenceの高次構造の解析

出芽酵母においては、転写開始点付近に見られるCT-rich sequenceは転写発現に少なからず影響を与えている。特に高度に発現している遺伝子の中でそのプロモーターにTATAAAboxやCAATboxが存在しない場合、CT-rich sequenceがプロモーターの役割をしていると考えられている[17]。また糸状菌でも多数の遺伝子にCT-rich sequenceが存在しており、本研究でシイタケより分離した3つ遺伝子のプロモーターにもCT-rich sequenceが存在することから、転写発現の際CT-rich sequenceが他の塩基配列と異なった立体構造（例えば二重らせん構造が緩んだ塩基対合開裂構造）をとり、RNAポリメラーゼ或いは転写因子が結合し易くしている可能性があるのではないかと考え、以下の解析を行った。

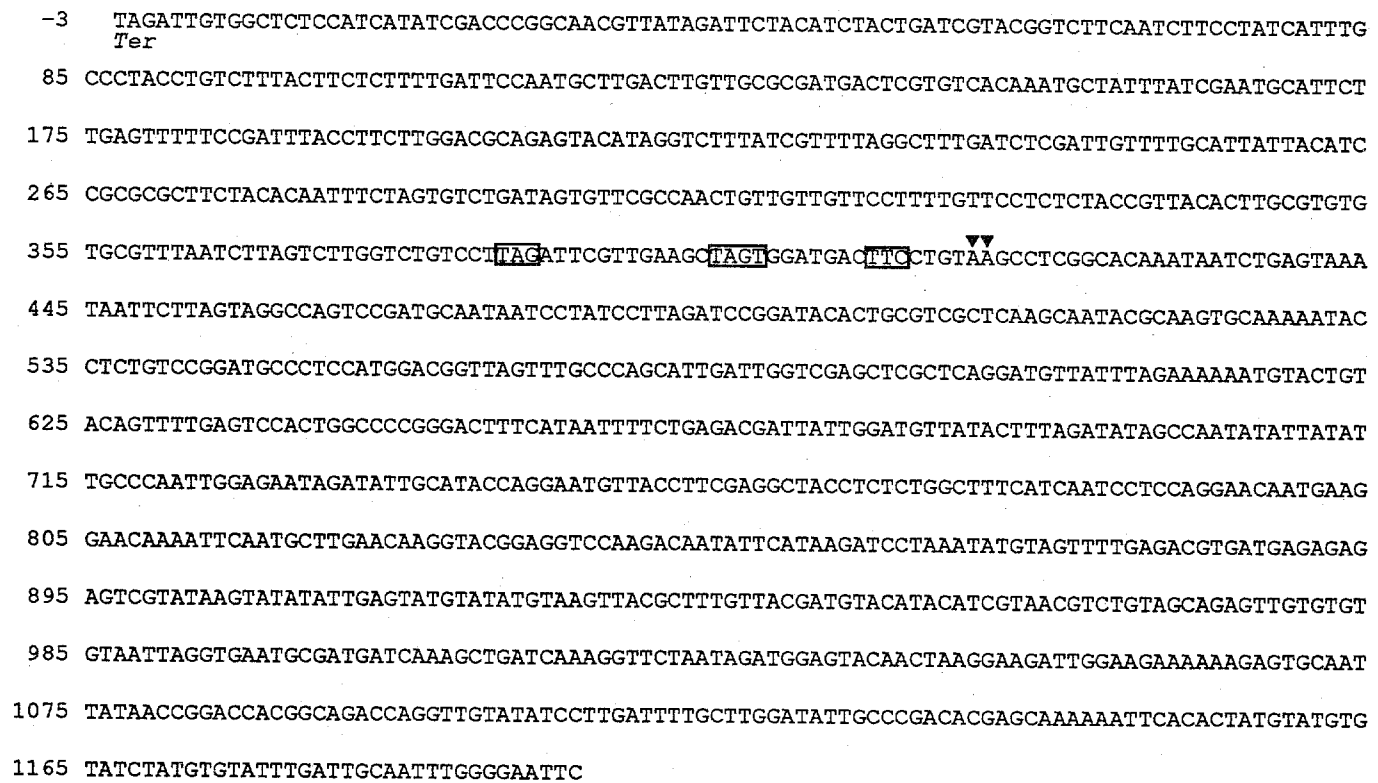


図4-7　*priA*遺伝子の下流域(1,200bp)の塩基配列

出芽酵母の転写終結・poly(A)シグナルの共通配列様配列は四角で囲んで示してある。
poly(A)付加部位は三角で示してある。*priA*遺伝子の終止コドンTAGは*Ter*で示してある。
左の数字は終止コドンからの塩基対数を示してある。

図4-8　*priB*遺伝子の上流域(1,415bp)の塩基配列

CAATbox,CT-rich sequence,AT-rich sequenceは白抜きの四角で示してある。転写調節因子QA1F結合部位様配列とGbox相同配列は網かけの四角で示し、転写開始点(tsp)は三角で示した。tspの解析に用いたプライマー3は横矢印で示してある。構造遺伝子の一部は破線で示し、下に対応するアミノ酸を示してある。数字は翻訳開始コドンATGのAを+1として示してある。

S1ヌクレアーゼは塩基対合開裂部位を認識して、閉環状DNAを開環状DNAに、開環状DNAを直鎖状DNAに変換する。この性質を利用して、*Le.ras*のプロモーター中のCT-rich sequenceを含む約130bpの*Eco*RI-*Rsa*I断片、 2つのTATAAAboxを含む約130bpの*Rsa*I-*Eco*RI断片、CT-rich sequenceとTATAAAboxを両方含む約260bpの*Rsa*I断片の 3つを各々pUC19に各々組み込んだプラスミドにS1ヌクレアーゼを作用させ直鎖状DNAに変換した。次に直鎖状DNAを制限酵素*Dra*I及び*Ssp*Iで消化した。S1ヌクレアーゼを作用させた際、塩基対合開裂部位が唯一なら直鎖状DNAは*Dra*Iで3断片、*Ssp*Iで2断片となり、 塩基対合開裂部位が増えれば増えるほど、断片の数は増えていく。結果は図4-9に示した。コントロールのpUC19の場合を見ると解るように、pUC19には元々S1ヌクレアーゼに高感受性部位が1つありほとんどその部位に作用している。4つの例を比較してみると、CT-rich sequenceを保持している 2つのプラスミドは他の2つよりかなり多くの断片が見られる。これら断片の中には、CT-rich sequence内でS1ヌクレアーゼが作用した断片も得られた(Data not shown)。これらのことは、CT-rich sequenceが自身のみ成らず周りのDNAの高次構造も変化させて S1感受性にし得ることを示すものであり、RNAポリメラーゼ,転写因子の結合を容易にしている可能性が示唆される。

第5節　*Le.ras*、*priA*及び*priB*遺伝子の制御領域の転写開始点の分析

分離した3つのプロモーターの3'末端の位置を特定するために、 プライマー伸長法によって転写開始点(tsp)を分析した。*Le.ras*、*priA*及び*priB*用のオリゴプライマーは各々プライマー1:5'-CGGGAGGAGGAGGCGTTGATGTACA-3'、 プライマー2:5'-CAAGCACGGACAATGCAACGACGCGTTTAAAGACAGTCAT-3'、プライマー3:5'-ATAATGGACAAGCTGATGATCCAACCTCGG-3'を用いて反応を行った（図4-4,4-6,4-8）。プライマー伸長法で作製した伸長産物のサイズは、 4M尿素-8%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動して、そのオートラジオグラフィーから判断した。

*Le.ras*のプライマーを用いて作製した伸長産物のオートラジオグラフィーを図4-10に示す。強いシグナルのバンドが1つと弱いシグナルのバンドが2つ見られた。横の塩基配列ラダーから判断すると、tspは各々翻訳開始コドンから156

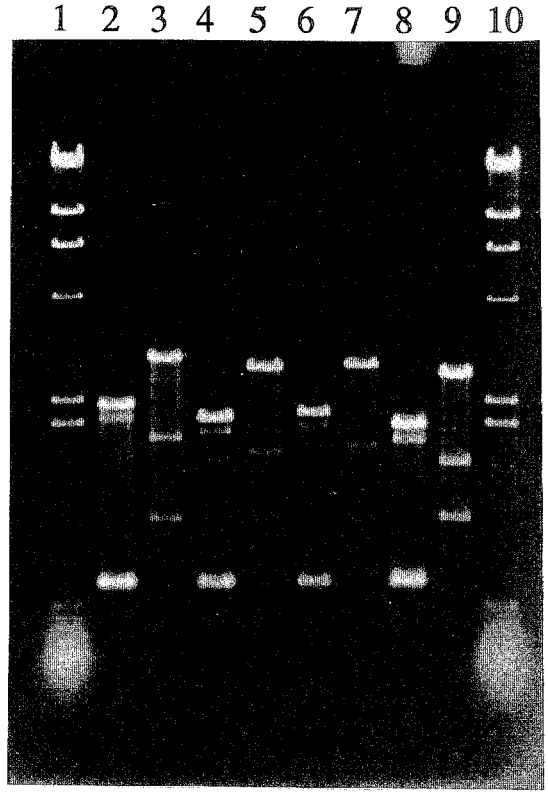


図4-9　プロモーター断片を持つ組み換え体プラスミド
DNA 分子内の塩基対合開裂部位の解析

レーン2,3:CT-rich sequenceとTATAAAbox の両方を含むpUC19, レーン 4,5:CT-rich sequenceを含むpUC19 レーン 6,7:TATAAAboxを含むpUC19, レーン 8,9:pUC19 レーン1,10: λ *Hin*dIII.
プラスミドの閉環状DNAをS1ヌクレアーゼにより塩基対合開裂部位で単鎖切断あるいは両鎖切断されて生ずる開環状DNAを単位長さ当たりの直鎖状DNAの割合が1：1となるように37℃で1時間分解する。次いでそれらを制限酵素*Dra*IとSspIで消化し電気泳動を行った。
レーン2,4,6,8:*Dra*I消化物、レーン3,5,7,9:*Ssp*I消化物

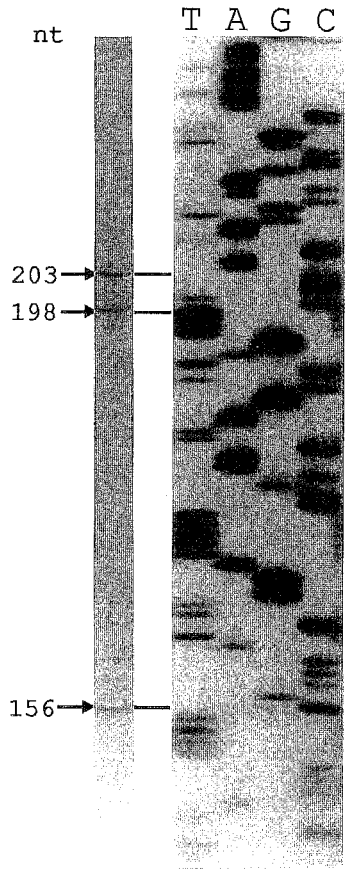


図4-10　プライマー伸長法による*Le.ras*遺伝子の転写開始点の解析

プライマーは本文中に示したプライマー1を用いた。左の数字は翻訳開始コドンATGのAからのヌクレオチド残基数を示してある。TAGCラダーは、プライマー1を用いたシーケンシング反応によって作製した。

塩基と198及び203塩基上流の位置に相当することが解った（図4-4）。 また強いシグナルのバンドを示したmajor tspは、 丁度CT-rich sequence上に位置していた。

*priA*のプライマーを用いて作製した伸長産物のオートラジオグラフィーを図4-11に示す。図から2つのバンドが見られた。 横の塩基配列ラダーから判断すると、tspは各々翻訳開始コドンから82及び121塩基上流の位置に相当することが解った（図4-6）。 またtspは各々TATAAAboxの24塩基下流と10塩基上流の位置に相当し、前者は丁度CT-rich sequence内に位置していた。多数の糸状菌で、tspはCT-rich sequence内またはその下流に存在することが報告されている。ほとんどの高等真核生物の遺伝子ではtspの30～60塩基上流にTATAAAboxが見られるが、アカパンカビの*am*遺伝子のようにtspの54塩基下流にTATAAAboxが見られる場合もある[17]。

*priB*のプライマーを用いて作製した伸長産物のオートラジオグラフィーを図4-12に示す。図から計11個のバンドが見られた。横の塩基配列ラダーから判断すると、tspは各々翻訳開始コドンから255,257,258,264,265,266,272,287,321,329,336塩基上流の位置に相当することが解った（図4-8）。 *priB*遺伝子のtspの数は、上記の2つ遺伝子のtspの数と比べてかなり多いことが解った。

第6節　担子菌の遺伝子発現ベクターの構築及び担子菌への導入の試み

4-6-1　担子菌の遺伝子発現ベクターの構築

ここまでの結果をもとに、様々な担子菌の遺伝子発現ベクターの構築を行った。プロモーターとしては、子実体形成過程全般で構成的でしかも高程度に転写発現している*Le.ras*のプロモーターを利用した。ターミネーター領域としては、poly(A)付加部位が明らかである*priA*のターミネーター領域を利用した。発現させる遺伝子は、形質転換株を選択するためのマーカー遺伝子として広く利用されているアミノグリコシド-3'-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子(*APHI*)[19]を用いた。

図4-13に発現ベクター作製過程の概略図を示した。*Le.ras*遺伝子のプロモー

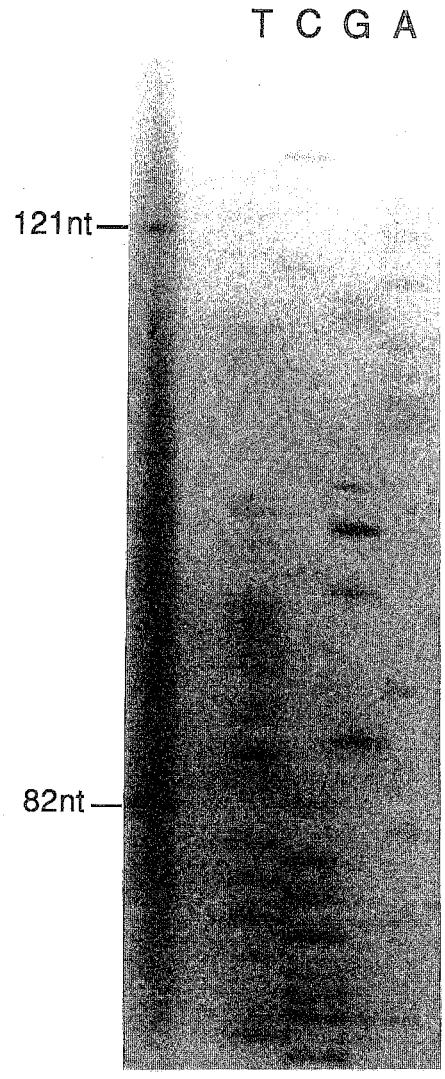


図4-11　プライマー伸長法による*priA*遺伝子の転写開始点の解析

プライマーは本文中に示したプライマー2を用いた。左の数字は翻訳開始コドンATGのAからのヌクレオチド残基数を示してある。TCGAラダーは、プライマー2を用いたシーケンシング反応によって作製した。

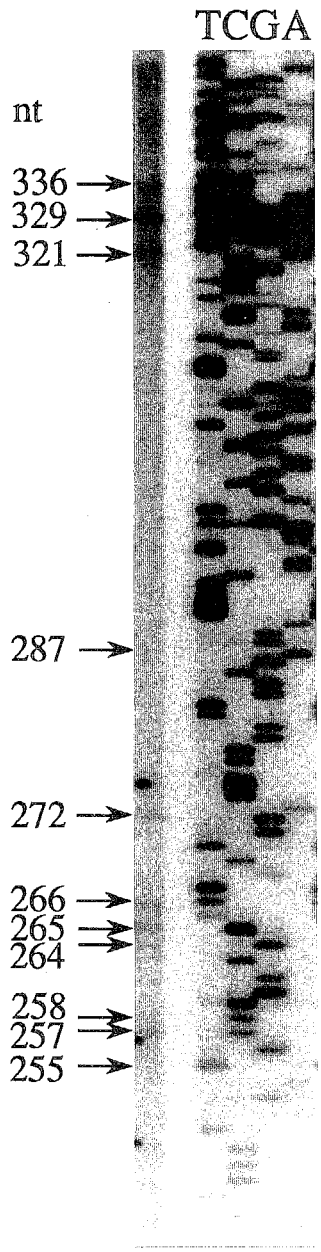


図4-12　プライマー伸長法による*priB*遺伝子の転写開始点の解析

プライマーは本文中に示したプライマー3を用いた。左の数字は翻訳開始コドンATGのAからのヌクレオチド残基数を示してある。TCGAラダーは、プライマー3を用いたシーケンシング反応によって作製した。

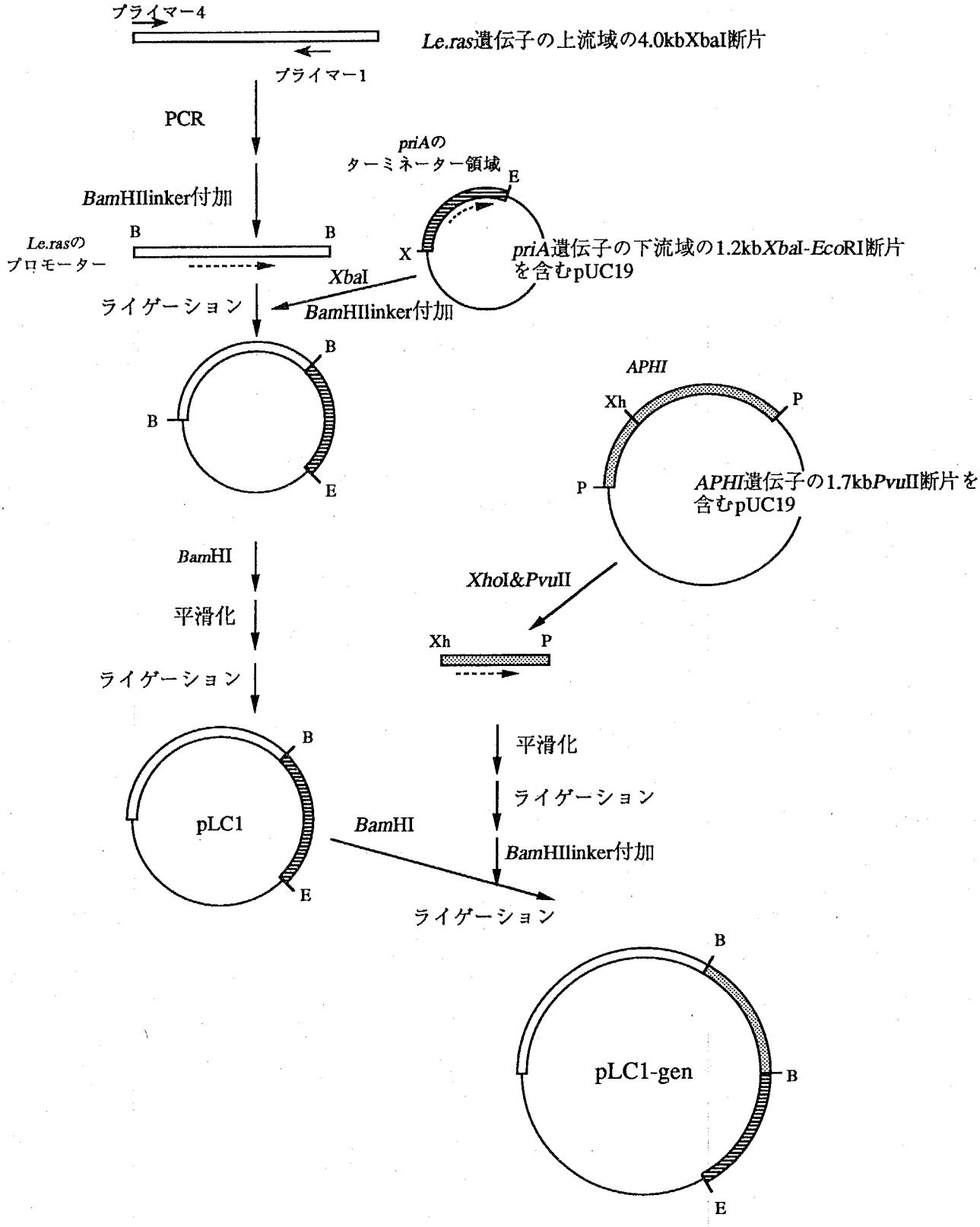


図4-13　遺伝子発現ベクターpLC1-gen作製過程の概略図

破線の横矢印は遺伝子の方向を示す。プライマー1とプライマー4は、本文中及び表4-3で示したものを使用した。各種制限酵素は以下の文字で示してある。
B;*Bam*HI,E;*Eco*RI,P;*Pvu*II,X;*Xba*I,Xh;*Xho*I

ターの下流側末端が翻訳開始コドンの直前になるように、上記のプライマー1とプライマー4:5'-TCTAGATAGGAAAAGTATGTTGTTTATGAT-3'を用いLe.ras遺伝子の約4kbXbaI断片を鋳型にしたPCR(Polymerase Chain Reaction)によって、ベクター用のLe.rasのプロモーターを作製した。この際、後で利用し易いようにプロモーターの両末端にはBamHIリンカーを付けた。ターミネーター領域はpriA遺伝子の1.3kbXbaI-EcoRI断片をそのまま用い、XbaI認識部位を平滑化しBamHIリンカーを付けた。これらプロモーターとターミネーター領域をライゲーションした後、プロモーターの上流側末端のBamHI認識部位を平滑化し再びライゲーションして担子菌用遺伝子発現カセットプラスミドpLC1を作製した。以前APHI遺伝子は、構造遺伝子とその上流500bpを含む1.7kbPvuII断片にプロモーターをつなげた時よりも翻訳開始コドンから30bp削った構造遺伝子を含む1.2kbXhoI-PvuII断片にプロモーターをつなげた時のほうが出芽酵母内で強いG418耐性が得られると報告されていた[117]。そこでAPHI遺伝子としては後者の1.2kbXhoI-PvuII断片を用い、この断片を平滑化しBamHIリンカーを付けた後、pLC1のBamHI認識部位に組み込んで担子菌用遺伝子発現ベクターpLC1-genを作製した。

4-6-2 担子菌用遺伝子発現ベクターを用いての担子菌への形質転換の試み

担子菌用遺伝子発現ベクターpLC1-genを用いて真正担子菌のヒトヨタケLT2-44株、ヒラタケp-11株、シイタケFMC2株への形質転換を試みた。形質転換を行うに当たってまず最初に細胞壁分解酵素で菌糸をプロトプラストにしなければならない。過去のいくつかの担子菌の形質転換法から考えて、この時点で少なくとも10^7～10^8個のプロトプラストを得なければならない。シイタケの場合、終始10^7個以上のプロトプラストは得られなかった。そこで10^7～10^8個のプロトプラストを得ることができたヒトヨタケ、ヒラタケでpLC1-genの導入を行った。形質転換株の選択は、200μg/mlのG418(Geneticin)(Sigma)を含む培地で行った。各々の菌で数回形質転換を行った結果、ヒトヨタケでは形質転換株を得ることができなかったが、ヒラタケでは1つの形質転換株R-1が得られた。R-1株はG418を含む新しい培地に植え継いでもG418耐性を維持していた（図4-14）。ヒラタケの場合、1992年になってコウジカビ用遺伝子発現ベクターpAN7-1を用

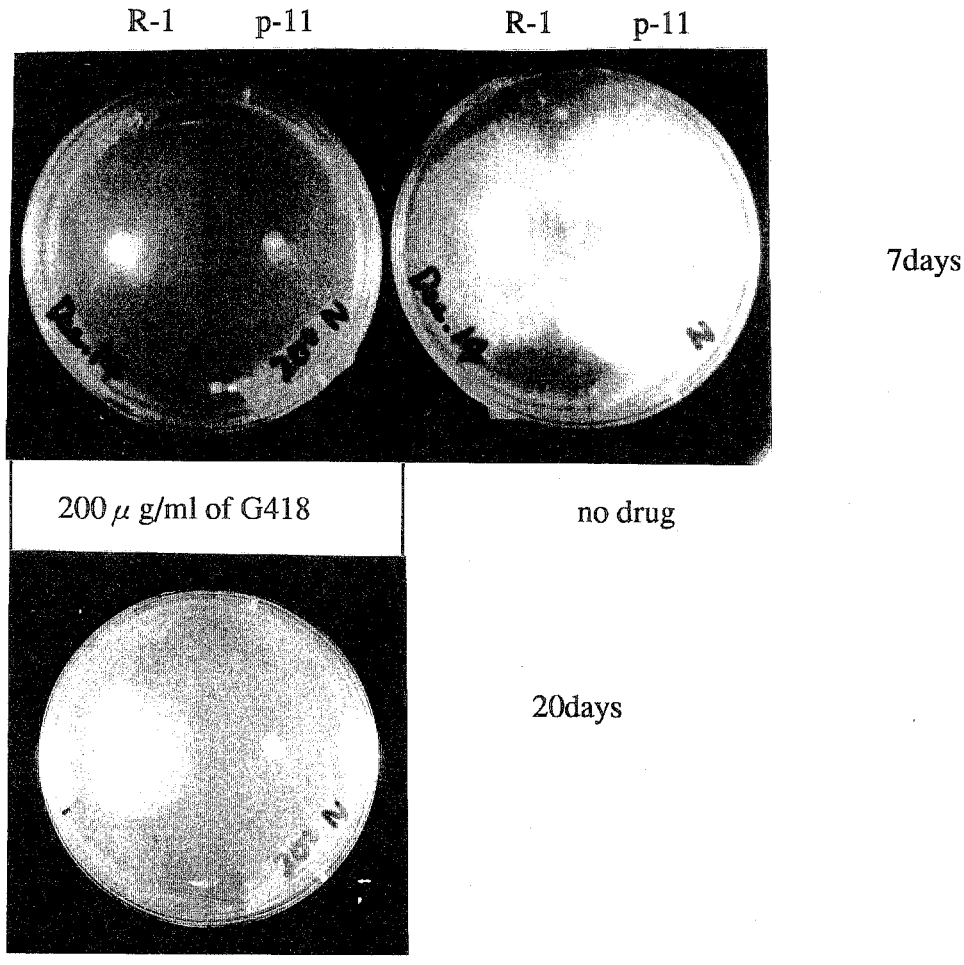


図4-14　ヒラタケの形質転換株R-1のG418耐性

ヒラタケの形質転換株R-1と元株p-11をPDA培地及び200 μ g/ml のG418を含むPDA培地にそれぞれ植菌して28℃で1週間培養した。

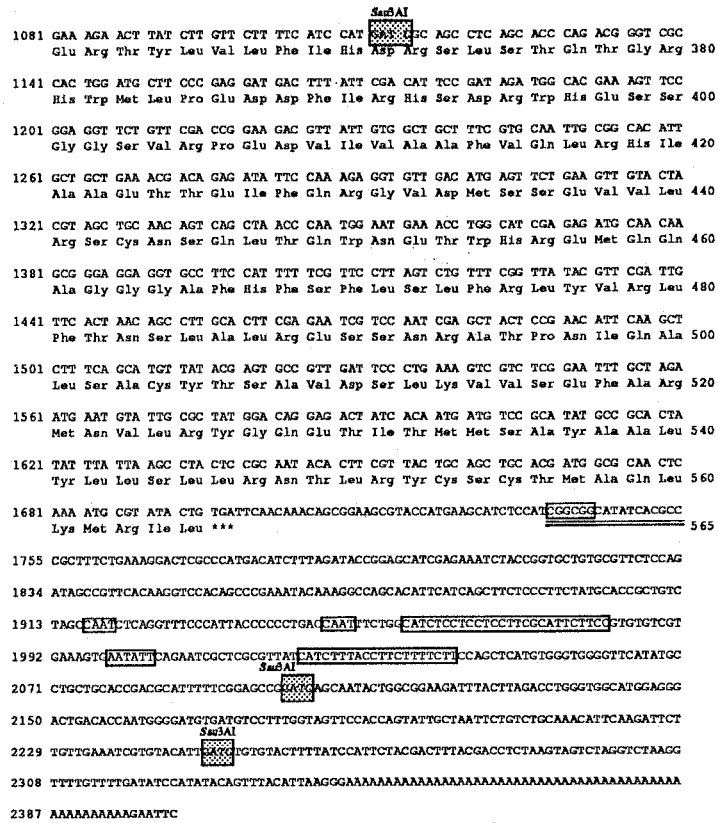
いての形質転換でハイグロマイシンB耐性株を得たとの報告[28]があったので、pAN7-1も同時に形質転換し100μg/mlのハイグロマイシンBを含む培地で選択したが耐性菌は1つも得られなかった。また、R-1株をG418を含まない培地に植え継いだ後再びG418を含む培地に植えてもG418耐性は維持していることから、pLC1-gen或いはその一部の*APHI*遺伝子を含む部分がヒラタケの染色体に組み込まれている可能性が高いと考えられる。

4-6-3 *priB*cDNA中の構造遺伝子下流で見つかったプロモーター様モジュールのプロモーター活性の解析

*priB*cDNA中の構造遺伝子下流で見つかったプロモーター様モジュールがプロモーターとしての機能を持っているかどうかを確かめるため、出芽酵母及び担子菌ヒラタケ内でのプロモーター活性の解析を行った。図4-15にプロモーター活性検定用に作製したプラスミド(p3'-APHI,pAPHI)を示した。プロモーター領域には、約1kbの*Sau*3AI断片を用いた。 これらのプラスミドを使ってまず出芽酵母(*S.cerevisiae*)D13-1A株の形質転換を行った。プラスミドには*TRP1*遺伝子が含まれているので、トリプトファン要求性で選択した時の形質転換株の数を100として G418耐性で選択した時との比率をプロモーター活性の強弱の度合いとした。表4- に示したように、p3'-APHIの値は以前報告された出芽酵母由来のプロモーターをつなげた *APHI*遺伝子を含むプラスミド(pKX34)の値には劣るもののpAPHIの値の約3倍を示した[117]。一方、pAPHIの値は以前報告されたAPHI遺伝子だけを含むプラスミドpScHIの値と1桁以上異なっていた[117]。 次に担子菌ヒラタケp-11株の形質転換を行った。その結果p3'-APHIを用いた形質転換では、1つの形質転換株B-1が得られた。B-1株も上記R-1株と同様の性質を示した。以上の結果より、プロモーター様モジュールが実際にプロモーターとして機能する可能性が高いと考えられる。

A

*priB*cDNAの下流側約1.3kb領域



B

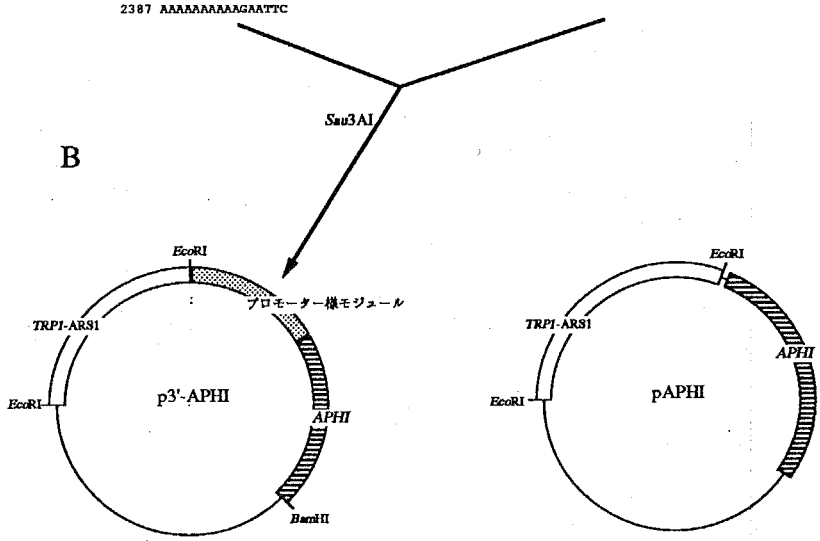


図4-15 *priB*cDNAの下流側に見いだされたプロモーター様モジュールの塩基配列(A)とそのプロモーター活性検定用ベクターの概略図(B)

(A)*priB*cDNAの下流側約1.3kbの塩基配列及び構造遺伝子に対応するアミノ酸配列を示してある。*Sau*3AI認識部位は網かけの四角で示してある。*Sau*3AIで切断した約1kbの断片をプロモーター用配列とした。CAAT様box,TATA様box,CT-rich sequence,GC様boxは四角で囲んで示してある。アカパンカビ(*N.crassa*)の転写調節因子QA1F認識部位様配列は二重下線で示してある。(B)*APHII*はpAJ50から、*TRP1*-ARS1はpTRP56から単離した。プロモーター様モジュールの*Sau*3AI断片はベクターの*Bam*HI部位に組み入れた。

表4-4　出芽酵母(*S. cerevisiae*)の形質転換実験におけるG418耐性株

プロモーター	プラスミド	trp^+株の数に対するG418耐性株の割合(%)
—	none	0
—	pAPHI(pScHI*)	11.0(0.8*)
*priB*の下流側プロモーター様モジュール	p3'-APHI	31.1
出芽酵母のadcIプロモーター	pKX34*	90.0*

*：pKX34とpScHIの値は文献117)より算出した。
—：は真核生物由来のプロモーターが存在しないことを表す。

4-6-4　シイタケMS-LE1610株の直鎖状DNAプラスミドpLLE1及びヒラタケMS-P023株の直鎖状DNAプラスミドpLPO3由来の出芽酵母内でARS能を持つ断片の担子菌内での性質

遺伝子発現とは別個の実験であるが、 担子菌内で働く自律複製に係わるDNA配列や遺伝子多コピー導入を惹起するDNA配列を持つベクターは 担子菌への形質転換効率を上昇させることが示唆されており、形質転換効率の上昇は遺伝子発現ベクターの分析を容易にさせることから、担子菌内で機能すると予想される自律複製に関連する DNA配列が担子菌の形質転換効率に及ぼす影響を検討した。当研究室で分離したシイタケMS-LE1610株の直鎖状プラスミドpLLE1及びヒラタケMS-PO23株の直鎖状プラスミドpLPO3由来の出芽酵母内で ARS能を持つ断片をヒトヨタケのインテグレーションベクターpCc1001（pUC8とヒトヨタケ*TRP1*遺伝子の組み換え体）[24]に組み込み、ヒトヨタケLT2-44株（trp^-）の形質転換を行った。その結果pCc1001と比べ数倍形質転換効率が上昇することが解った。組み込んだDNA断片がARSとして機能しているかどうかは明かではないが、効率の良い遺伝子発現ベクターの作製のための一要素と成り得るだろう。

第7節　考察

真正担子菌シイタケより単離した *Le.ras*、*priA*及び*priB*遺伝子の制御領域を分離し、その構造特性を解析した。次に制御領域の中から*Le.ras*遺伝子のプロモーターと*priA*遺伝子のターミネーター領域を選択し遺伝子発現ベクターを構築した。そして遺伝子発現ベクターを用い真正担子菌ヒトヨタケ、ヒラタケ、シイタケの形質転換を試み、ヒラタケより形質転換菌を得た。また*priB*cDNAの下流側に存在するプロモーター様モジュールが出芽酵母とヒラタケでプロモーターとして機能する可能性を示唆した。更に別個の実験であるが、当研究室において出芽酵母内で ARS能を持つとしてpLLE1とpLPO3から単離した断片がヒトヨタケ内で形質転換効率を数倍上昇させることを観察した。

シイタケより単離した3つの遺伝子のプロモーターには、全てCT-rich sequenceが認められた。糸状菌では、アカパンカビの*acp-1*,*pl-1*、コウジカビの*aldA*,*argB*,*benA*,*oliC*,*pgkA*,*tpiA*,*tubC*、スエヒロタケの*dikA*(*Sc1*)の遺伝子で各々CT-rich sequenceが見つかっており、 スエヒロタケの*dikA*(*Sc1*)遺伝子以外は全てATブロックはあってもTATAAAboxは存在しなかった[17]。担子菌に限って見ると、*Le.ras*遺伝子と*priA*遺伝子のプロモーターにはTATAAAboxが存在し、*priB*遺伝子のプロモーターには存在しないこと、スエヒロタケの*dikA*(*Sc1*)遺伝子は子実体形成可能な二次菌糸時に高程度転写発現（全mRNAの0.5%）すること[81]から考えると、担子菌遺伝子が多量に転写発現するためには TATAAAboxと CT-rich sequenceの両方を兼ね備えていることが必要なのかもしれない。 最近まで担子菌遺伝子の制御領域に関する報告はほとんど無かったが、1992年になって*P.chrysosporium*のリグニン過酸化酵素(*LG2*)遺伝子[118]及びツクリタケ(*Agaricus bisporus*)のセルロース資化特異性の遺伝子(*cel1*)[119]のプロモーター配列がそれぞれ報告された。それらの報告には遺伝子の転写発現に関する研究は示されていなかったが、今後転写発現を解析することによって担子菌におけるTATAAAbox及び CT-rich sequenceと転写発現との関係が明らかになるであろう。

*Le.ras*遺伝子のプロモーターと現在までに報告されている他の生物に存在す

る*ras*遺伝子のプロモーターとを比較した（図4-16）。 図からも解るように哺乳類のプロモーターとショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*) やシイタケのプロモーターでは明らかに異なっている。哺乳類のプロモーターで幾つも見られるGCboxはショウジョウバエやシイタケでは見られず、反対にTATAAAboxは哺乳類のプロモーターには見られなかった。ただしCT-rich sequenceはシイタケのプロモーターだけに存在していた。この様な違いは進化的にも興味深いところである。

*priA*遺伝子と*priB*遺伝子は共に子実体形成過程における転写発現パターンが類似していることから、双方の遺伝子のプロモーターをコンピューターで比較、検討したところ、両方に共通する配列が幾つか見いだされたが 1つを除いては既知のDNA結合性タンパク質の認識配列と相同性を示す配列と一致しなかった。唯一相同性を示した配列は、光による遺伝子発現誘導に関与するシスエレメントとして同定されたGboxであった。このことから類推すると、担子菌の子実体発生誘導或いは促進のための外部環境因子の中に光も含まれており、多数の担子菌で子実体形成に対する光の効果が報告されシイタケでも光照射が子実体原基形成を誘導することが示されている[125]ことから、子実体原基時における*priA*遺伝子と*priB*遺伝子の転写発現の増大は、光による誘導がその一因かもしれない。

*priB*遺伝子の上流領域には 4つのアカパンカビの転写調節因子QA1F結合部位様配列が見られた。 図3-8に示したようにQA1FはZnクラスターモチーフを形成しDNAに結合する転写調節因子の1つであり、この仲間に出芽酵母のGAL4やコウジカビのQUTA等が含まれる。また、Znクラスターモチーフを取り得る転写調節因子のDNA認識部位は各々が類似した配列となっている。 もしPRIBがZnクラスターモチーフを取り得るなら、PRIBが*priB*遺伝子のプロモーター上のQA1F結合部位様配列に結合し転写調節を行うという自己調節(Auto regulation) の働きを有している可能性が考えられる。例えばQA1Fは転写活性化因子であるが、*qa-1F*遺伝子の上流には転写抑制遺伝子*qa-1S*が逆を向いて存在していて、両遺伝子の上流に当たるところにQA1Fの認識部位があり、ここにQA1Fが結合することによってQA1Sの発現を高め自らの発現調節を行っていると考えられている[94]。さらに*priB*遺伝子のプロモーター様モジュールが担子菌内で機能することが解

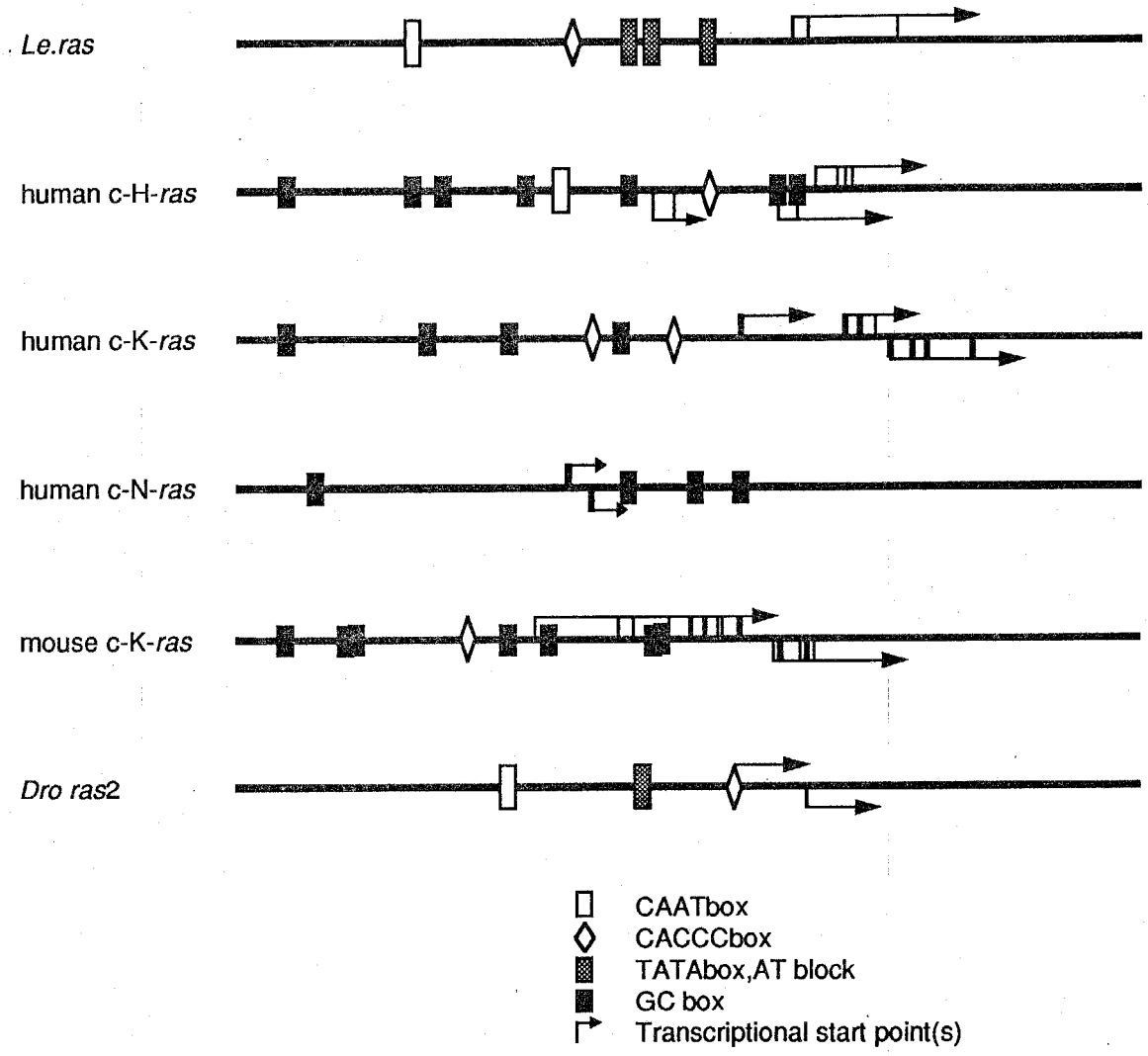


図4-16　*Le.ras*及び各種*ras*遺伝子のプロモーターに存在する
基本DNA配列の模式図

り、そのモジュール内にQA1F認識部位様配列が見つかったことから、*priB*遺伝子の周辺にPRIBによって転写調節される遺伝子がクラスターを成しているかもしれない。この仮説を証明するためには第一にPRIBの単離が必要であり、現在当研究室では大腸菌によるPRIBの生産を試みている。

ターミネーター領域のpoly(A)シグナルとしては、哺乳類の共通配列AATAAA---$(GT)_n$or$(T)_n$と出芽酵母の共通配列ATG---TAGT(TATGT)---TTTが報告されており、*Le.ras*遺伝子の下流域には哺乳類の配列に類似した配列と出芽酵母の配列に類似した配列が、*priA*遺伝子の下流域には出芽酵母の配列に類似した配列のみが見つかった。哺乳類ではAATAAAがpoly(A)付加シグナル、$(GT)_n$or$(T)_n$が切断部位と厳密に分けられていて、両方が必ず必要である報告されている[120]。糸状菌では、以前コウジカビの*pga*遺伝子の下流域で哺乳類の共通配列が見つかっているが、他の遺伝子にはAATAAAと$(GT)_n$or$(T)_n$が揃って存在することはなく哺乳類とは違ったプロセッシング機構であると考えられている[121]。

シイタケの形質転換は、DNA導入前のプロトプラスト調製で失敗した。数種の細胞壁分解酵素を単独もしくは混合して検討した結果、1%のCellurase Onozuka R-10（ヤクルト製薬工業）、0.1%のChitinase(Sigma)で28℃、3～4時間反応させた時が最適であったが、それでも10^7個弱のプロトプラストしか得られなかった。今後10^8個ぐらいのプロトプラストを一度に調製するためには、培養方法、反応系のスケールアップ等の更なる改良が必要である。ヒトヨタケの形質転換では、G418耐性株を得ることができなかった。この理由の1つとしては、以前にヒトヨタケの染色体DNAは広範囲に亘って2塩基CpGのシトシンがメチル化されていることが示されており[122]、またpAN7-1を用いたスエヒロタケの形質転換実験で、導入されたpAN7-1が過度にメチル化され遺伝子発現が抑制されたことが報告されていることから[123]、pLC1-gen中の大腸菌由来の*APHI*遺伝子がヒトヨタケ内で過度にメチル化され遺伝子発現が抑制されているためにpLC1-genを保持した菌がG418の培地で生育できないとも考えられる。

ヒラタケの形質転換では、形質転換株が計2つ得られた。R-1株及びB-1株は400μg/mlのG418を含む培地でも生育でき、またG418を含まない培地でしばらく培養した後でも、G418耐性を維持していたことからプラスミド全体或いは*APHI*遺伝子を含む一部分がヒラタケの染色体に組み込まれていると予想される。こ

の結果より、pCL1-genが担子菌用遺伝子発現ベクターとして有効であることが確認できた。pLC1-genは担子菌由来の遺伝子発現制御領域を持ち担子菌内での有効性が確認させた初めてのベクターである。また*priB*遺伝子のプロモーター様モジュールが担子菌用のプロモーターとして機能することが示唆された。

出芽酵母内で ARSとして働くシイタケMS-LE1610株の直鎖状プラスミドpLLE1及びヒラタケMS-PO23株の直鎖状プラスミドpLPO3由来の断片をヒトヨタケのpCc1001に組み込み、ヒトヨタケLT2-44株(*trp*$^-$)の形質転換を行った。その結果pCc1001と比べ数倍形質転換効率が上昇することが解った。この実験だけでは明確なことは言えないが、形質転換効率の上昇度合いから見て上記の断片は担子菌内において自律複製因子としてではなく染色体挿入に関わる DNA配列として機能していると推測される。

今後は、形質転換効率を上げることが必要になるであろう。現在は数回の形質転換を行って形質転換株が1つ取れるか否かの状態で、 担子菌の他の遺伝学的な研究に使える段階ではない。形質転換効率を上げるための研究としては、形質転換法の改良と自律複製に関わるDNA配列或いは染色体挿入に関わるDNA配列の分離が考えられる。まずはヒトヨタケの形質転換効率を数倍上昇させた断片を使ってみることが先決であろう。そして効率良く形質転換株が得られるようになれば、担子菌における様々な現象の分子遺伝学的研究[124)]がいままで以上に進歩するだろう。

第５章　結論

担子菌は、真菌類における代表的な形態分化である子実体形成や他の生物には見られない長期間にわたる重核相(n+n)世代 を持つ等の生命現象を有する興味ある研究対象である。このような担子菌特有の現象を分子レベルで理解するための手段のひとつとして、担子菌を宿主とする遺伝子操作技術の開発が必要である。

そこで本研究では、担子菌の遺伝子操作系の確立を目指し、シイタケを対象に子実体形成に関連する或いは関連すると予想される遺伝子のクローニング及びそれら遺伝子の制御領域の分離を行い、分離した制御領域を用いて担子菌用遺伝子発現ベクターを構築することを目的として実験を行い、以下のような結果が得られた。

Ⅰ.シイタケFMC2株の染色体DNAに対し出芽酵母のアデニレートシクラーゼ遺伝子*CYR1*と癌遺伝子v-Ha-*ras*をプローブにしてサザンブロット解析を行ったところ、v-Ha-*ras*と相同性を持つ2種類のハイブリダイゼーションバンドを得た。この内の1つをまず単離し、さらにサブクローニングによって v-Ha-*ras*とハイブリダイズする断片を分離しその塩基配列を決定すると共に、シイタケのcDNAライブラリーからサブクローニングした断片とハイブリダイズするcDNAを単離し塩基配列を決定した。その結果*ras*相同遺伝子と判り*Le.ras*と命名した。*Le.ras*遺伝子は217アミノ酸をコードし、その内部が 6つのイントロンによって分断されていた。*Le.ras*遺伝子産物(*Le.*Ras)は分裂酵母の*Sp.*Rasと最も相同性が高くN末端から80アミノ酸で86%、続く80アミノ酸が74%の相同性を示した。 子実体形成過程における*Le.ras*遺伝子の転写発現パターンを解析したところ、過程全般を通して構成的に発現していることが解り、細胞内cAMP量と*Le.ras*発現量との間に関連性を認められなかった。

Ⅱ.*v-Ha-ras*と相同性を持つもうひとつのハイブリダイゼーションバンドからD

NA断片を単離しその塩基配列を決定すると共に、単離した断片の子実体形成過程における転写発現パターンを解析した。その結果、特に子実体原基時で高程度に転写発現していることが解り、単離した断片上の遺伝子を*priA*と命名した。更にシイタケのcDNAライブラリーから*priA*遺伝子とハイブリダイズするcDNAを単離し塩基配列を決定した。*priA*遺伝子は2つのイントロンを含み、258個のアミノ酸をコードしていた。*priA*遺伝子産物(PRIA)は、セリン、スレオニン、プロリン残基に富んだ推定 26.7kDaのタンパク質でN末側に疎水領域、C末側に膜結合性配列があることが示唆された。 PRIAはRasタンパク質とは相同性がなく新規のタンパク質であると考えられた。そしてPRIAには、Znフィンガー様モチーフが2つとZnクラスター様モチーフが1つ認められた。

Ⅲ.当研究室の遠藤が子実体原基時に多量に発現するmRNAから作製した cDNAライブラリーよりcDNAクローンを単離し、*priB*cDNAと命名してその塩基配列を解析していたので、本研究では、*priB*cDNAの塩基配列を確定すると共に子実体形成過程における転写発現パターンを解析した。 *priB*遺伝子産物(PRIB)は568個のアミノ酸から構成される約64kDaのタンパク質であると推定された。 *priB*遺伝子の転写発現量は、*priA*遺伝子同様子実体原基時に特に増大していたが、*priA*遺伝子に比べ幾分少な目であることが解った。 さらにPRIBは、N末側にZnクラスターモチーフとそれに続いてbZIP構造を取り得ることが示唆された。

Ⅳ.担子菌用遺伝子発現ベクターを構築するために、*Le.ras*、*priA*及び*priB*遺伝子の制御領域を各々分離し、塩基配列を決定した。*Le.ras*遺伝子のプロモーターにはCAATbox,CACCCbox,CT-rich sequenceが1つずつとTATAAAboxが連続して2つ存在していた。*Le.ras*遺伝子のターミネーター領域には共通シグナル配列として哺乳類の poly(A)シグナルAATAAA---$(GT)_n$or$(T)_n$様配列と出芽酵母の転写終結･poly(A)シグナルTAG---TAGT(TATGT)---TTT様配列が見い出された。 *priA*遺伝子のプロモーターには GCbox,CAATbox,TATAAAbox,Gbox,CT-rich sequenceが各々1つずつ存在していた。 *priA*遺伝子のターミネーター領域には出芽酵母の転写終結･poly(A)シグナルTAG---TAGT(TATGT)---TTT様配列が見い出された。*priB*遺伝子のプロモーター及びその上流領域にはCAATboxが連続して2つ、Gbox

とCT-rich sequenceが1つずつ、転写調節因子QA1F結合様配列が 4つ存在していた。 さらにプライマー伸長法により各々の遺伝子の転写開始点(tsp)を分析した。*Le.ras*遺伝子のtspは翻訳開始コドンから156塩基と198及び203塩基上流の位置であった。156塩基上流のtspは丁度CT-rich sequence上であった。*priA*遺伝子のtspは翻訳開始コドンから82及び121塩基上流の位置であった。82塩基上流のtspは丁度CT-rich sequence上であった。*priB*遺伝子のtspは翻訳開始コドンから 255,257,258,264,265,266,272,287,321,329,336塩基上流の位置であった。

Ⅴ.*Le.ras*遺伝子のプロモーター、 *priA*遺伝子のターミネーター領域及び大腸菌由来の*APHI*遺伝子を使って担子菌用遺伝子発現ベクターpLC1-genを構築し、シイタケ、ヒラタケ、ヒトヨタケの形質転換を試みた。その結果、ヒラタケより1つの形質転換株R-1を得ることができた。 またR-1株はpLC1-gen或いは*APHI*遺伝子を含む部分が染色体に組み込まれていると推測された。ここに担子菌用遺伝子発現ベクターとしての有効性が確認できた。*priB*遺伝子の下流にあるプロモーター様モジュールに*APHI*遺伝子をつないだプラスミドp3'-APHIでヒラタケの形質転換を行ったところ、1つの形質転換株B-1を得ることができた。 B-1株も上記R-1株と同じ形態を示した。 この結果より、プロモーター様モジュールが担子菌内でプロモーターとして機能していることが示唆された。

Ⅵ.出芽酵母内でARSとして働くシイタケMS-LE1610株の直鎖状プラスミドpLLE1及びヒラタケMS-PO23株の直鎖状プラスミドpLPO3由来の断片を、ヒトヨタケのpCc1001に組み込み、ヒトヨタケLT2-44株(*trp*$^-$)の形質転換を行った。 その結果、pCc1001そのものと比べ数倍形質転換効率が上昇することが解った。

以上、担子菌遺伝子をクローニングし、その遺伝子制御領域用いて担子菌用遺伝子発現ベクターを構築して、担子菌の形質転換を行い外来遺伝子を発現させることに成功した。

最後に本研究が今後の担子菌の遺伝子操作系の確立への礎となることを願い終了とする。

参考文献

1) Kirk,T.K. and Farrell,L.R. *Ann.Rev.Microbiol.* 41, 465-565 (1987)

2) 古川久彦, *化学と生物* 26, 631-639 (1988).

3) Skrzynia,C., Binninger,D.M., AlspaughII,J.A. and Pukkila,P.J. *Gene* 81, 73-82 (1989).

4) Dons,J.J.M., Mulder,G.H., Rouwendal,G.J.A., Springer,J., Bremer,W. and Wessels,J.G.H. *EMBO J.* 3, 2101-2106 (1984).

5) Schuren,F.H.J. and Wessels,J.G.H. *Gene* 90, 199-205 (1990).

6) Cullen,D. and Kersten,P. *Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi.* (eds Kinghorn,J.R. and Turner,G.) 100-131 (BLACKIE A. & P., London. 1992).

7) Wang,J., Holden,D.W. and Leong,S.A. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85, 865-869 (1988).

8) Bej,A.K. and Perlin,M.H. *Gene* 80, 171-176 (1989).

9) Williamson,D.H. *Yeast* 1, 1-14 (1985).

10) Revuelta,J.L. and Jayaram,M. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83, 7344-7347 (1986).

11) 坂口健二, *遺伝子工学* (安藤忠彦/坂口健二編) 392-415 (共立出版 1987).

12) Tsukuda,T., Carleton,S., Fotheringhan,S. and Holloman,W.K. *Mol. Cell.Biol.* 8, 3703-3709 (1988).

13) Randall,T., Rao,T.R. and Reddy,C.A. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 161, 720-725 (1989).

14) Randall,T., Reddy,C.A. and Boominathan,K. *J.Bacteriol.* 173, 776-782 (1991).

15) Katayose,Y., Kajiwara,S. and Shishido,K. *Nucleic Acids Res.* 18, 1395-1400 (1900).

16) 梶原 将, *東京工業大学修士論文* (1990)

17) Gurr, S.T., Unkles, S.E. and Kinghorn, J.R. *Gene Structure in Eukaryotic Microbes* (ed Kinghorn, J.R.) 93-139 (I.R.L. Press, Oxford 1988)

18) Gritz, L. and Davies, J. *Gene* 25, 179-188 (1983).

19) Oka, A. Sugisaki, H. and Takanami, M. *J. Mol. Biol.* 147, 217-226 (1981).

20) Jorgensen, R.A., Rothstein, S.J. and Reznikoff, W.S. *Mol. Gen. Genet.* 177, 65-72 (1979).

21) Banks, G.R., *Curr. Genet.* 7, 73-77 (1983).

22) Tully, M. and Gilbert, H.J. *Gene* 36, 235-240 (1985).

23) Munoz-Rivas, A., Specht, C.A. Drummond, B.J., Froeliger, E., Novotny, C.P. and Ullrich, R.C. *Mol. Gen. Genet.* 205, 103-106 (1986).

24) Binninger, D.H., Skrzynia, C., Pukkila, P.J. and Casselton, L.A. *EMBO J.* 6, 835-840 (1987).

25) Alic, M., Kornegay, J.R., Pribnow, D. and Gold, M.H. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 406-411 (1989).

26) Burrows, D.M. Elliott, T.J. and Casselton, L.A. *Curr. Genet.* 17, 175-177 (1990).

27) Barrent, V., Dixon, R.K. and Lemke, P.A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, 313-316 (1990).

28) Peng, M., Singh, N.K. and Lemke, P.A. *Curr. Genet.* 22, 53-59 (1992).

29) Marmeisse, R., Gay, G., Debaud, JC. and Casselton, L.A. *ibid.* 22, 41-45 (1992).

30) Fincham, J.R.S. *Microbiol. Rev.* 53, 148-170 (1989).

31) Uno, I. and Ishikawa, T. *J. Bacteriol.* 113, 1240-1248 (1973).

32) Uno, J. and Ishikawa, T. *ibid.* 113, 1249-1255 (1973).

33) Takagi, Y., Katayose. Y. and Shishido, K. *FEMS Microbiol. Lett.* 55, 275, 278 (1988).

34) Kawai, G. and Ikeda, Y. *Biochem. Biophys. Acta* 719, 612-618 (1982).

35) Kawai, G., Ikeda, Y. and Tubaki, K. *Agric. Biol. Chem.* 49, 2137-2146 (1985).

36) Murao,S., Hayashi,H. and Tarui,N. *ebid.* 48, 1669-1677 (1984).

37) Broach,J.R. *Trends Genet.* 7, 28-33 (1991).

38) Pitt,G.S., Milona,N., Borleis,J., Lin,K.C., Reed,R.R. and Devreotes,N. *Cell* 69, 305-315 (1992).

39) Reymond,C.D., Gomer,R.H., Mehdy,M.C. and Firtel,R.A. *Cell* 39, 141-148 (1984).

40) Robbins,S.M., Williams,J.G., Jermyn,K.A., Spiegelman,G.B. and Weeks,G. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86, 938-942 (1989).

41) Khosla,M., Robbins,S.M., Spiegelman,G.B. and Weeks,G. *Mol.Cell. Biol.* 10, 918-922 (1990).

42) Nakajima,M., Sheikh,Q.I., Yamaoka,K., Yui,Y., Kajiwara,S. and Shishido,K. *Mol.Gen.Genet.* 236, (1992) in press.

43) Toda,T., Uno,I., Ishikawa,T., Powers,S., Kataoka,T., Broek,D., Cameron,S., Broach,J., Matsumoto,K. and Wigler,M. *Cell* 40, 27-36 (1985).

44) Fukui,Y., Kozasa,T., Takeda,T. and Yamamoto,M. *Cell* 44, 329-336 (1986).

45) Nielsen,O., Davey,J. and Egel,R. *EMBO J.* 11, 1391-1395 (1992).

46) Kataoka,T., Broek,D. and Wigler,M. *Cell* 43, 493-505 (1985).

47) Harvey,J.J. *Nature* 204, 1104-1105 (1964).

48) Katayose,Y., Shishido,K. and Ohomasa,M. *Biochim Biophys Res. Commun.* 138, 1110-1115 (1986).

49) Yanish-Perron,C., Vieira,J. and Messing,J. *Gene* 33, 103-119 (1985).

50) Appleyard,R.K. *Genetics* 39, 440-452 (1954).

51) Young,R.A. and Davis,R.W. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 80, 1194-1198 (1983).

52) Hunh,T.V. Young,R.A. and Davis.R.W. *DNA Cloning* A Proctical Approach, Vol.1. (ed Glover,D.M.) 49-72 (IRLPress, Oxford 1985).

53) Clewll,D.B. and Hellinski,D.R. *J.Bacteriol.* 110, 667-676 (1972).

54) Sambroook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. *Molecular Cloning.* 2nd edition A Laboratory manual. (Cold Sproing Harbor Lab. Press 1989).

55) Radloff, R., Bauer, W. and Vinotrad, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **57**, 1514-1521 (1967).

56) Yamamoto, K.R. Alberts, B.M. Benzinger, R., Lawhorne, L. and Treiber, G. *Virology* 40, 734-744 (1970).

57) Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Sedman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. *Current Protocols in Molecular Biolgy* (John Wiley & Sons 1987).

58) Chirgwin, J.J. Przbyla, A.E., MacDonald, R.J. and Rutter, W.J. *Biochemistry* **18**, 5294 (1979).

59) Glisin, V., Crkvenjakov, R. and Byus, C. *Biochemistry* 13, 2633 81973).

60) Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. *Gene* 96, 23-28 (1990).

61) Southern, E.M. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517 (1975).

62) Beuton, W.D. and Davis, R.W. *Science* **196**, 180-182 (1977).

63) Sanger, F., Nicklen, S. and Covlson, A.R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467 (1977).

64) Miller, J.H. *Experiments in Molecular Genetics* (Cold Spring Harbor Lab. (1972)).

65) Capon, D.J., Chen, E.Y. Levinson, A.D. Seeburg, P.H. and Goeddel, D.V. *Nature* 302, 33-37 (1983).

66) DeFeo-Jones, D., Scolnick, E.M. Koller, R. and Dhar, R. *Nature* 306, 707-709 (1983).

67) Powers, S., Kataoka, T., Fasano, O., Goldfarb, M., Strathern, J., Broach, J. and Wigler, M. *Cell* 36, 607-612 (1984).

68) Fukui, Y. and Kaziro, Y. *EMBO J.* 4, 687-691 (1985).

69) Hancock, J.F., Magee, A.I., Childs, J.E. and Marshaall, C.J. *Cell* 57, 1167-1177 (1989).

70) Gilman, A.G. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 615-649 (1987).

71) Borbocid, M. *ibid.* 56, 779-827 (1987).

72) Takai,Y., Kaibushi,K., Kikuchi,A. and Kawata,M. *Int.Rev.Cytol.* 133, 187-230 (1992).

73) Kawata,M., Farnsworth,C.C., Yoshida,Y., Gelb,M.H. Glomsmet,J.A. and Takai,Y. *Proc.Natl.Acad. Sci. USA* 87, 8960-8964 (1990).

74) 菊池　章, *生化学* 64, 1079-1102 (1992).

75) Van Arsdell,J.N. Kwok,S. Schweickart,V.L. Ladner,M.B. Gelfand,D.H. and Innis,M.H. *BIO/TECHNOLOGY* 5, 60-64 (1987).

76) Mount,S.M. *Nucleic Acids Res.* 10, 459-472 (1982).

77) Shishido,K. International Symposium of Recent Topics in Genetics, Physiology and Technology of teh Basidiomycetes *proceedings* 119-124 (1992).

78) Wessels,J.G.H. *Mycol.Res.* 96, 609-620 (1992).

79) Wessels,J.G.H. Mulder,G.H. and Sprinnger,J. *J.Gen.Microbiol.* 133, 2557-2561 (1987).

80) Ruiters,M.H.J., Sietsma,J.H. and Wessels,J.G.H. *Exp. Mycol.* 12, 60-69 (1988).

81) Mulder,G.H. and Wessels,J.G.H. *ibid.* 10, 214-227 (1986).

82) 宮本　力, *BIO media* 5, 1170-1174 (1990).

83) Kyte,J. and Doolittle,R.F. *J.Mol.Biol.* 157, 105-132 (1982).

84) Johnson,P.F. and Mcknight,S.L. *Annu.Rev.Biochem.* 58, 799-839 (1989).

85) Landschulz,W.H., Johnson,P.F. and Mcknight,S.L. Science 240, 1759-1764 (1985).

86) Kouzarides,T., Ziff,E. *Nature* 336, 646-651 (1988).

87) Sassone-Corsi,P., Ransone,L.J., Lamph,W.W. and Verma,I.M. *ebid.* 336, 692-695 (1988).

88) Rhodes,D. and Klug,A. *Nucleic Acids and Molecular Biolgy* (eds Eckstein,F. and Lilley,D.H.J.) vol.2 144-166 (Springer-Verlag 1989).

89) Vallee, B. L. Coleman, J. E. and Auld, D. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 999-1003 (1991).

90) Marmorstein, R., Carey, M., Ptashne, M. and Harrison, S. C. *Nature* 356, 408-414 (1992).

91) Pan, T. and coleman, J. E. *ibid.* 87, 2077-2081 (1990).

92) Zhou, K. Brisco, R. G. Hinkkanen, E. and Kohlhaw, G. B. *Nucleic Acids Res.* 15, 5261-5273 (1987).

93) Beri, R. K. Whittington, H., Roberts, C. F. and Hawkins, A. R. *ebid.* 15, 7991-8001 (1987).

94) Geever, R. E. Huiet, L., Baum, J. A., Tyler, B. M., Patel, V. B., Rutledge, B. J., Case, M. E. and Giles, N. H. *J. Mol. Biol.* 207, 15-34 (1989).

95) Kammever, B., Guyonvarch, A. and Hubert, J. C. *J. Mol. Biol.* 180, 239-250 (1984).

96) Pefeifer, K., Kim, K. S., Kogan, S. and Guarente, L. *Cell* 56, 291-301 (1989).

97) Kim, J. and Michels, C. A. *Curr. Genet.* 14, 319-323 (1988).

98) Balzi, E., Chen, W., Ulaszewski, S., Capieaux, E. and Goffeau, A. *J. Biol. Chem.* 262, 16871- (1987).

99) Messenguy, F., Guyonvarch, A. and Hubert, J. C. *J. Mol. Biol.* 180, 239-250 (1984).

100) Salmerov, J. M., Jr., and Johnston, S. A. *Nucleic Acids Res.* 14, 7767-7781 (1986).

101) Andre, B. *Mol. Gen. Genet.* 220, 269-276 (1990).

102) Johnston, M. *Nature* 328, 353-355 81987).

103) Giniger, E. Varnum, S. M. and Ptashne, M. *Cell* 40, 767-774 (1985).

104) Proudfoot, N. *Cell* 64, 671-674 (1991).

105) Hanahan, D. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580 (1983).

106) Karn, J., Brenner, S., Barnett, L. and Cesareni, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5172-5176 (1980).

107) Miyajima,A., Nakayama,N., Miyajima,I., Arai,N., Okayama,H. and Araki,K. *Nucleic Acids Res.* 12, 6397-6414 (18984).

108) Frischauf,A., Lehrach,H., Poustka,A., and Murray,N. *J.Mol.Biol.* 170, 827-842 (1983).

109) Mcknight,S.L. and Kingsbury,R. Science 217, 316-324 (1982).

110) Ito,H., Tukuda,K. Murata,K. and Kimura,A. *J. Bacteriol.* 153, 163-168 (1983).

111) Mclauchlan,J., Gaffney,D., Whitton,J.L. and Clemants,J.B. *Nucleic Acids Res.* 13, 1347-1368 (1985).

112) Zaret,K.S. and Sherman,F. *Cell* 28,563-573 (1982).

113) Nagy,F., Kay,S.A. Chua,N.-H. *Trends Genet.* 4, 37-42 (1988).

114) Gilmartin,P.M., Sarokin,L., Memelink,J., Chua,N.-H. *Plant Cell* 2, 369-378 (1990).

115) Schulze-letert,P., Dangl,J.L., Becker-Andre,M., Hahlbrock,J. and Schulz,W. *EMBO J.* 8, 651-656 (1989).

116) 篠崎一雄, *蛋白質核酸酵素* 36, 115-127 (1991).

117) Lang-Hinrichs,C., Berdorff,D. Secfelott,C. and Stahl,U. *Appl. Microbiol.Biotechnol.* 30, 388-394 (1989).

118) Rich,T.G.,Jr.,and Cold,M.H. *Gene* 118, 73-80 (1982).

119) Raguz,S., Yague,E., Wood,W.A. and Thurston,C.F. *ibid.* 118, 183-190 (1992).

120) Wickens,M. *Trends Biochem.* 15, 277-281 (1990).

121) Unkles,S.E. *Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi.* (eds Kinghorn,J.R. and Turner,G.) 28-53 (BLACKIE A. & P.,London. 1992).

122) Zolan,M.E. and Pukkila,P.J. *Mol.Cell.Biol.* 6, 195-200 (1986).

123) Mooibroek,H., Kuipers,A.G.J., Sietsma,J.H., Punt,P.J. and Wessels, J.G.H. *Mol.Gen.Genet.* 222, 41-48 (1990).

124) Shisihdo, K. *Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi.* (eds Kinghorn, J.R. and Turner, G.) 201-213 (BLACKIE A. & P., London. 1992).

125) Ishikawa, H. *J. Agric. Lab. (Jpn)* 8 1- (1967).

報告論文

1) Hori, K., Kajiwara, S., Saito, T., Miyazawa, H., Katayose, Y. and Shishido, K. Cloning, sequence analysis and transcriptional expression of a *ras* gene of the edible basidiomycete *Lentinus edodes*. Gene 105 91-96 (1991).

2) Kajiwara, S. and Shishido, K. Characterization of the promoter region of the basidiomycete *Lentinus edodes Le.ras* gene. FEMS Microbiol. Lett. 92 147-150 (1992).

3) Kajiwara, S., Yamaoka, K., Hori, K., Miyazawa, H., Saito, T., Kanno, T. and Shishido, K. Isolation and sequence of a developmentally regulated putative novel gene, *priA*, from the basidiomycete *Lentinus edodes*. Gene 114 173-178 (1992).

関連論文

1) Katayose, Y., Kajiwara, S. and Shishido, K. The basidiomycete *Lentinus edodes* linear mitochondrial DNA plasmid contains a segment exhibiting a high autonomously replicating sequence activity in *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res. 18 1395-1400 (1990).

2) Katayose, Y., Yui, Y., Kajiwara, S. and Shishido, K. A wide distribution of linear DNA plasmids in the basidiomycetes *Lentinus edodes* and *Pleurotus ostratus*. J. Gen. Appl. Microbiol. 38 289-292 (1992).

3) Nakajima, M., Sheikh, Q. I., Yamaoka, K., Yui, Y., Kajiwara, S. and Shishido, K. Bending of DNA segments with *Saccharomyces cerevisiae* autonomously replicating sequence activity, isolated from basidiomycetes mitochondrial linear plasmids. Mol. Gen. Genetics 236 (1992) in press.

謝辞

本研究を進める上で終始熱心に御指導、御助言くださいました
本学助教授　宍戸和夫博士に心から感謝いたします。

さらに、菌株を分与してくださいました大政正武博士（農水省森林総合研究所）、柳園江博士（農水省食品研究所）、古川久彦博士、石原宏基氏（大分きのこ研究指導センター）、明治製菓（株）生物科学研究所の皆様、DNAを提供くださいました高橋秀夫博士（東京大学応用微生物研究所）に感謝いたします。

また、一部の実験及び論文作成の際に御助力をいただいた
本学技官　小松睦子氏に感謝いたします。

続いて、共に学び、協力し合い研究を進行させた宍戸研究室OBの皆様方に御礼申し上げます。

最後に長い学生生活を終始援助してくれた両親、梶原勇、梶原智恵子に深く御礼申し上げます。

１９９３年　１月

梶原 将